

# **Untersuchung der Pathomechanismen hypertrophieassoziiierter Mutationen im MYL3 Gen**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r   r e r u m   n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fachbereich Biologie

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Janine Lossie

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter:

1. Prof. Dr. Wolfgang Höhne
2. Prof. Dr. Ingo Morano
3. Prof. Dr. Michael Bader

eingereicht am: 02. Februar 2012

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Mai 2012

---

---

*„Nicht das Beginnen wird belohnt, sondern einzig und allein das Durchhalten.“*

*Katharina von Siena*

---

## Zusammenfassung

Myosin II, das Motorprotein des kardialen Muskels, besteht aus zwei schweren und vier leichten Ketten. Der Hebelarmbereich der schweren Myosinkette (MyHC) enthält das IQ-Konsensus-Motiv für die Bindung der essentiellen leichten Myosinkette (ELC), welche wesentlich für eine normale Kraftentwicklung des Myosinmoleküls ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf, mit hypertropher Kardiomyopathie assoziierte, Mutationen im humanen essentiellen ventrikulären leichten Myosinketten (hVLC1)-Gen (MYL3) untersucht (E56G, A57G, E143K, M149V, R154H). Von keiner dieser Mutationen war der Pathomechanismus bekannt. Ziel der Arbeit war es, die Effekte der Mutationen im MYL3-Gen auf Proteinstruktur und Funktion zu untersuchen und daraufhin einen möglichen Pathomechanismus zu formulieren. Dazu erfolgten Strukturanalysen (CD-Spektren, Schmelzkurven, FLIM), Versuche auf Protein- und Zellebene (Protein-Protein-Interaktionsstudien, Sorting Assay) sowie Untersuchungen *in vitro* (Zell-Verkürzungsmessungen, isoliert perfundierte Herzen nach Langendorff) und *in vivo* (Echokardiographie) im transgenen Mausmodell.

In Protein-Protein-Interaktionsstudien konnte nachgewiesen werden, dass die Affinitäten der A57G, E143K, M149V, R154H mutierten hVLC1 zur schweren Myosinkette im Vergleich zum normalen hVLC1/MyHC-Komplex signifikant verringert waren. Im Besonderen wies die E56G mutierte hVLC1 (hVLC1<sup>E56G</sup>) mit einer fast dreißigfach reduzierten Bindungsstärke den deutlichsten Effekt auf und wurde darum in der Folge im Detail untersucht.

CD-Spektren und Schmelzkurven konnten keine Unterschiede zwischen den Sekundärstrukturen von hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> nachweisen. Jedoch zeigte die *fluorescence lifetime imaging microscopy* (FLIM) mit permeabilisierten Psoas- und Soleusmuskelfasern eine signifikant längere Fluoreszenzdauer der hVLC1<sup>E56G</sup>-Fasern, was ein Hinweis auf eine veränderte Proteinstruktur sein könnte.

Bei Einzeltransfektionsversuchen mit neonatalen Rattenkardiomyozyten wurde ein verringerter Einbau der niedrig-affinen hVLC1<sup>E56G</sup>-Form in das Sarkomer beobachtet. Im kompetitiven Sorting Assay kam es in 95 % der Zellen zu einem präferierten Einbau vom hVLC1, während hVLC1<sup>E56G</sup> weitestgehend zytoplasmatisch vorlag.

Die in dieser Arbeit erstmals im transgenen Tiermodell untersuchte E56G Mutation führte in transgenen Mäusen zur gewebespezifischen Expression von hVLC1<sup>E56G</sup> im Herzen und zur partiellen Substitution gegen die endogene murine VLC1 (~ 36 %). Transgene hVLC1<sup>E56G</sup>-Tiere zeigten mit drei Monaten signifikante Vergrößerungen des interventrikulären Septums und der hinteren linken Ventrikelwand im Vergleich zu transgenen hVLC1 Tieren und somit sehr zeitig erste Anzeichen einer HCM.

In Zell-Verkürzungsmessungen mit adulten isolierten Kardiomyozyten wiesen hVLC1<sup>E56G</sup> Tiere tendenziell verringerte Verkürzungsamplituden und reduzierte Kontraktion- und Relaxationsraten auf. Bei Untersuchungen der kontraktile Parameter des isoliert perfundierten Herzens konnte eine signifikante Verschlechterung des entwickelten linksventrikulären Drucks und eine signifikant verringerte Relaxationsgeschwindigkeit in Tieren der E56G mutierten Linien nachgewiesen werden. Somit könnte sich, über eine Struktur- und Affinitätsänderung des hVLC1<sup>E56G</sup>-Proteins zur MyHC, eine Beeinträchtigung der Myosinfunktion und nachfolgend der funktionalen Parameter des gesamten Herzens entwickeln.

Schlagwörter: ELC, Myosin, Mutation, HCM, Proteinstruktur, Kardiomyozyten, Transgene Mauslinien

---

## Abstract

Myosin II, the motor protein of cardiac muscle, is composed of two heavy chains (MyHC) and four non-covalently linked light chains (MLC). The lever arm of the MyHC contains the IQ motif that binds the essential myosin light chain (ELC), which is necessary for the normal force production of the myosin molecule.

Five with HCM associated mutations in the human ventricular essential myosin light chain (hVLC1) -gen (MYL3) were investigated in this study (E56G, A57G, E143K, M149V, R154H). The pathomechanisms of the mutations were not known.

Aim of the study was i) to test the hypothesis that mutations in the ventricular essential myosin light chain affect the protein structure, the binding to the IQ motif of MyHC and the force production of the myosin molecule as well as ii) to postulate an accompanying pathomechanism.

Structural analyses (circular dichroism, melting curves, fluorescence lifetime imaging microscopy), functional investigations (surface plasmon resonance spectroscopy, sorting assay) and *in vivo* (echocardiography) and *in vitro* studies in a transgenic mouse model were performed.

The affinity of M149V, E143K, A57G, and R154H mutated hVLC1/MyHC complexes were significantly lower compared to the normal hVLC1/MyHC complex interaction. In particular the E56G mutation induced an about 30fold lower MyHC affinity and was therefore investigated in-depth.

Circular dichroism and melting curves showed no significant changes between hVLC1 and hVLC1<sup>E56G</sup>. However, the fluorescence lifetime of M. soleus and M. psoas fibers replaced with hVLC1<sup>E56G</sup> increased significantly compared with hVLC1 replaced fibers. This indicates a shift in the protein structure.

Single cell transfection of neonatal rat cardiomyocytes showed a reduced incorporation of hVLC1<sup>E56G</sup> into the sarcomere. Competitive co-transfection of cardiomyocytes revealed a very low sorting specificity of E56G-mutated hVLC1 compared to normal hVLC1.

Within this study a transgenic mouse-model of the E56G mutation was generated for the first time. Transgenic mice expressing hVLC1 or hVLC1<sup>E56G</sup> in the heart were subjected to echocardiography at three month and displayed a significant increase in interventricular septum and left ventricular posterior wall thickness in transgenic hVLC1<sup>E56G</sup> animals, indicating early onset of HCM.

Cell shortening, contraction and relaxation velocity was reduced by trend in isolated adult cardiomyocytes of hVLC1<sup>E56G</sup> mice compared to transgenic hVLC1 animals. Likewise, the developed left ventricular pressure and relaxation velocity were significantly reduced in mice with the E56G mutation.

Disturbed myosin binding of E56G-mutated hVLC1 due to changes in the protein structure may lead to impaired force production of the myosin molecule resulting in hypertrophic cardiomyopathy eventually.

Keywords: ELC, myosin, mutation, HCM, proteinstructure, cardiomyocytes, transgenic mice

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>V</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>VI</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>IX</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Aufbau des Sarkomers in Kardiomyozyten .....	1
1.2 Myosin .....	2
1.3 Elektromechanische Kopplung .....	6
1.4 Gleitfilamenttheorie und Querbrückenzyklus .....	8
1.6 Die hypertrophe Kardiomyopathie .....	9
1.6 Die humane essentielle ventrikuläre leichte Myosinkette .....	12
1.7 Mutationen im MYL3 Gen .....	15
1.8 Fragestellung .....	19
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>21</b>
2.1 Material .....	21
2.1.1 Chemikalien .....	21
2.1.2 Oligonukleotide .....	21
2.1.3 Antikörper, Enzyme, Antibiotika .....	22
2.1.4 Puffer und Stammlösungen .....	23
2.1.5 Molekulargewichtsmarker .....	27
2.1.6 Versuchstiere und Zellen .....	27
2.1.7 Narkotika und Blutverdünner .....	28
2.1.8 Bakterienstämme .....	28
2.1.9 Plasmidvektoren .....	28
2.1.10 Weitere Materialien und Kits .....	29
2.1.11 Geräte .....	30
2.2 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden .....	31
2.2.1 Primerdesign, Polymerase-Kettenreaktion und Sequenzierung .....	31
2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese, DNA-Messung, Restriktionsverdau .....	33

2.2.3	Klonierung, Ligation und Transformation in <i>E.coli</i> .....	34
2.2.4	Mutagenese .....	35
2.2.5	Expression rekombinanter Proteine .....	36
2.2.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblot.....	37
2.3	Ultrazentrifugation .....	38
2.4	CD-Spektrum und Schmelzkurve.....	38
2.5	Oberflächen-Plasmon-Resonanz Analyse .....	39
2.6	Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM).....	41
2.7	Sorting Assay .....	42
2.7.1	Isolierung neonataler Kardiomyozyten .....	43
2.7.2	Kompetitives Sorting Assay von hVLC1 vs. hVLC1 <sup>E56G</sup> .....	43
2.8	Generation der transgenen Mauslinien TGM/hVLC1 und TGM/hVLC1 <sup>E56G</sup> .....	44
2.8.1	Genotypisierung .....	45
2.8.2	mRNA Isolierung, Reverse Transkription und quantitative RT-PCR .....	46
2.8.3	Kontrolle der Substitution auf Proteinebene in Myofibrillen .....	48
2.8.4	Alpha- und beta-Myosin Verteilung .....	49
2.8.5	Echokardiographie .....	50
2.9	Zell-Verkürzungsmessungen an isolierten adulten Kardiomyozyten ..	50
2.10	Das isoliert perfundierte Herz nach Langendorff .....	51
2.10.1	Präparation und Perfusion muriner Herzen.....	52
2.11	Statistische Auswertungen.....	54
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>55</b>
3.1	Molekularbiologische und mikrobiologische Ergebnisse .....	55
3.1.1	Erstellung der Konstrukte von hVLC1 .....	55
3.1.2	Erstellung des rβ-MyHC <sub>664-915</sub> IQ2 <sup>ala4</sup> Konstruktes .....	57
3.1.3	hVLC1, rβ-MyHC <sub>664-915</sub> und rβ-MyHC <sub>664-915</sub> IQ2 <sup>ala4</sup> Proteine lassen sich im SDS-Gel und Westernblot nachweisen .....	58
3.2	rβ-MyHC <sub>664-915</sub> IQ2 <sup>ala4</sup> weist eine gestrecktere Konformation als rβ- MyHC <sub>664-915</sub> auf .....	61
3.3	rβ-MyHC <sub>664-915</sub> und rβ-MyHC <sub>664-915</sub> IQ2 <sup>ala4</sup> liegen in Lösung als Monomere vor .....	62
3.4	CD-Spektrum und Schmelzkurve sind von der E56G Mutation nicht beeinflusst.....	63

3.5	Mutationen in der hVLC1 führen zu einer niedrigeren Affinität zwischen dem VLC/MyHC Komplex .....	64
3.6	hVLC1 <sup>E56G</sup> erhöht die Fluoreszenzlebensdauer in permeabilisierten Soleus und Psoasmuskelfasern.....	66
3.7	hVLC1 wird im kompetitiven Sorting Assay bevorzugt in das Sarkomer eingebaut.....	68
3.8	Analyse der transgenen Mauslinien TGM/hVLC1 und TGM/hVLC1 <sup>E56G</sup> .....	71
3.8.1	Das hVLC1 bzw. hVLC1 <sup>E56G</sup> Konstrukt lässt sich über Genotypisierung in den transgenen Tieren nachweisen .....	72
3.8.2	In den transgenen Mauslinien lassen sich hohe mRNA Level für hVLC1 bzw. hVLC1 <sup>E56G</sup> mittels qRT-PCR nachweisen .....	73
3.8.3	Murine VLC1 wird in den Myofibrillen der transgenen Tiere durch humane VLC1 bzw. VLC1 <sup>E56G</sup> substituiert .....	74
3.8.4	Alpha- und beta-Myosinverteilung sind in transgenen Tieren nicht verändert.....	76
3.8.5	Transgene hVLC1 <sup>E56G</sup> Tiere zeigen eine beginnende Hypertrophie im Echo.....	77
3.9	Adulte isolierte Kardiomyozyten von transgenen hVLC1 <sup>E56G</sup> Tieren zeigen eine verringerte Zell-Verkürzungsamplitude.....	78
3.10	Die E56G Mutation führt zu einer signifikant verringerten linksventrikulären Druckentwicklung und reduzierten Relaxationsraten in transgenen hVLC1 <sup>E56G</sup> Tieren .....	80
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>84</b>
<b>5.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>98</b>
<b>6.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>113</b>
6.1	Vektorenkarten.....	113
6.2	Marker .....	114
6.3	Nukleotid- und Proteinsequenzen.....	115
6.4	Abbildungsverzeichnis .....	116
6.5	Tabellenverzeichnis .....	119
<b>DANKSAGUNG.....</b>		<b>121</b>
<b>PUBLIKATIONEN .....</b>		<b>122</b>
<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>		<b>123</b>



---

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
bpm	Schläge pro Minute ( <i>beats per minute</i> )
bzw.	beziehungsweise
BSA	Rinderserum-Albumin
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure Dinatriumsalz
ELC	essentielle leichte Kette ( <i>essential light chain</i> )
<i>et al.</i>	und andere
FAM	6-carboxyfluorescein
FKS	Fetales Kälberserum
FS	Verkürzungsfraction ( <i>fractional shortening</i> )
fw	vorwärts ( <i>forward</i> )
GST	Glutathion-S-Transferase
Hepes	4 (2-hydroxyethyl)-Säure 1 piperazineethanesulfonic
HRP	Meerrettich Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
hVLC1	humane essentielle ventrikuläre leichte Myosinkette
IPTG	Isopropylthio-β-D-galactopyranosid
IVS	Intraventrikuläres Septum
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante

---

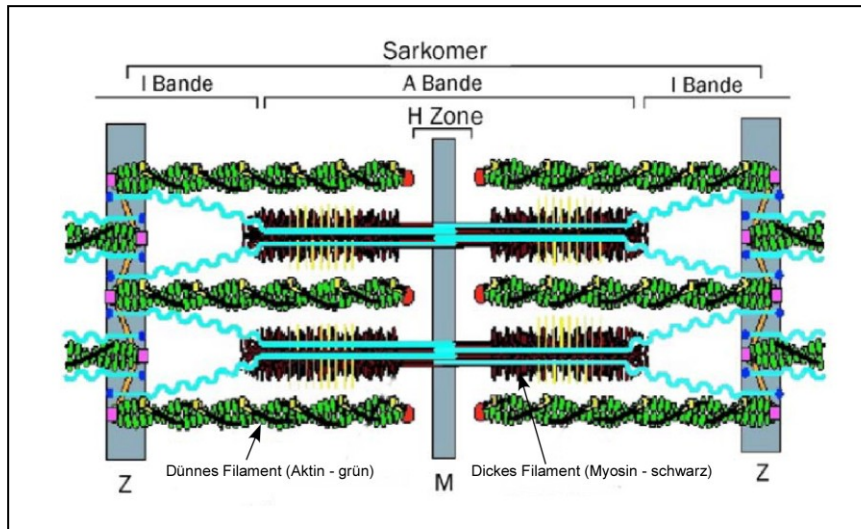
LV	linker Ventrikel
LVPW	linker Ventrikel hintere Wand ( <i>left ventricle posterior wall</i> )
max.	maximale
MyHC	Myosin schwere Kette ( <i>myosin heavy chain</i> )
mRNA	messenger-RNA
N	Anzahl
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P <sub>i</sub>	Phosphatrest
rev	rückwärts ( <i>reverse</i> )
RLC	regulatorische leichte Kette ( <i>regulatory light chain</i> )
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
RU	<i>Response Units</i> (relative Einheit bei Biacore)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler ( <i>Standard Error of Mean</i> )
SPR	Oberflächen Plasmon Resonanz
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat/EDTA
TAMRA	Tetramethylrhodamin
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
Temed	N,N,N,N'-Tetramethyldiamin
TGM	Transgene Maus
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	units
UV	Ultraviolettes Licht
vs.	versus

# 1. Einleitung

Um seine Funktion als Träger von Nährstoffen und Blutgasen erfüllen zu können, muss das Blut ständig im Organismus zirkulieren. Angetrieben wird es dabei durch das Herz, ein muskuläres Hohlorgan. Die Kontraktion des Herzens erfolgt, unter Verbrauch von ATP, über die zyklische Interaktion von Myosin Typ II mit dem Aktinfilament. Hypertrophe Kardiomyopathien (HCM) sind Herzmuskelerkrankungen, bei denen genetische Veränderungen (Mutationen) in bestimmten Genen als krankheitsrelevante Ursachen nachgewiesen werden konnten. Durch Vererbung treten sie oftmals familiär gehäuft auf (fHCM) und können über einen progredienten Verlauf zum Herzversagen (Herzinsuffizienz) führen. Herzinsuffizienz ist ein krankhafter Zustand, bei dem die Blutversorgung der Organe durch das versagende Herz nicht mehr ausreichend gewährleistet wird. Daher ist die Klärung der Pathogenese von spezifischen Mutationen von großem Interesse und könnte über eine optimierte und individualisierte Behandlung und Prävention der betroffenen Patienten zusätzlich zu einer Verringerung der Untersuchungs- und Therapiekosten beitragen.

## 1.1 Aufbau des Sarkomers in Kardiomyozyten

Das Sarkomer ist die grundlegende kontraktile Einheit von Kardiomyozyten und besteht aus dicken und dünnen Filamenten. Die Sarkomereinheiten sind parallel angeordnet und durch Z-Scheiben miteinander verbunden. Im Polarisationsmikroskop treten helle I-Banden (isotroph) und dunkle A-Banden (anisotroph) auf. Im Zentrum der A-Bande befindet sich eine helle H-Zone mit Mittellinie (M-Linie), während die I-Banden durch die Z-Scheibe mittig getrennt werden. Hervorgerufen wird die unterschiedliche Lichtbrechung durch die Überlappung von dicken Myosin- und dünnen Aktin-Filamenten im Sarkomer (Gregorio et al., 2000).



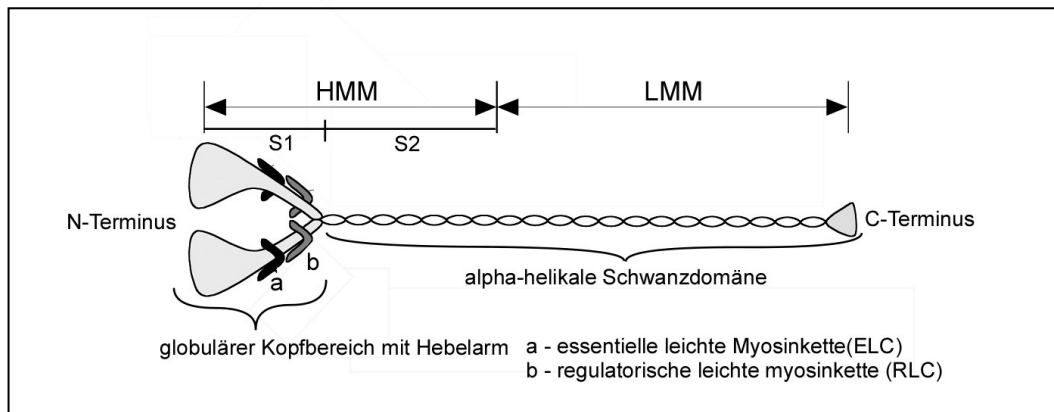
**Abb. 1: Schematische Darstellung der Hauptbestandteile des Sarkomers von Kardiomyozyten.** Aktin (grün), Myosin (schwarz), regulatorische Proteine Tropomyosin (schwarze Linien um Aktin) und Troponin (gelbe Kugeln am Tropomyosin), dünne Filamente sind über  $\alpha$ -Aktinin (orange) in der Z-Linie verankert und mit CapZ (pinke Quadrate), bzw. in der A-Linie über Tropomodulin (rot), abgeschlossen. Die dicken Filamente sind über Titin (türkis) mit der M- und der Z-Linie verbunden und enthalten zusätzlich Myosin Bindungsprotein C (gelbe Längsstreifen), Telethonin (blaue Quadrate in der Z-Linie) (modifiziert nach Gregorio et al., 2000).

Hauptbestandteil der dicken Filamente ( $1,6 \mu\text{m} \times 100 \text{ nm}$ ) ist Myosin; zusätzlich sind stabilisierende und regulatorische Proteine, wie Titin oder das Myosin Bindungsprotein C enthalten. So sind die dicken Filamente im Sarkomer über Titin an der M- und Z-Linie fixiert, und die Kontraktilität kann über die verschiedenen Phosphorylierungsstellen des Myosin Bindungsproteins C moduliert werden (Winegrad, 1999). Die wichtigste Komponente der dünnen Filamente ( $1 \mu\text{m} \times 50 \text{ nm}$ ) ist Aktin, welches zusammen mit regulatorischen Proteinen wie  $\alpha$ -Tropomyosin, Troponin I, C und T Komplexe bildet und in der Z-Scheibe verankert ist (Gregorio et al., 2000) (Abb. 1). Die verschiedenen Sarkomerproteine wie Titin,  $\alpha$ -Aktinin, CapZ oder Nebulette, welche nicht direkt am Kontraktionsprozess beteiligt sind, stellen wichtige Komponenten für die Stabilisierung der Sarkomerstruktur und Übertragung der Kraft dar (Schiaffino et al., 1996).

### 1.2 Myosin

Myosin wurde erstmals im Jahre 1864 von W. Kühne beschrieben (Kühne, 1864). Verschiedene Forscher analysierten später die Myosinstruktur genauer (Weber, 1935; Engelhardt et al., 1939) und konnten Myosin mit Hilfe proteolytischer Enzyme in verschiedene Untereinheiten zerlegen (Gergely, 1950; Perry, 1951). Über den

Verdau mit Trypsin wurde leichtes Meromyosin (LMM, ca. 150 kDa) von schwerem Meromyosin (HMM, ca. 350 kDa) unterschieden (Mihályi et al., 1953; Szent-Györgyi, 1953). Schweres Meromyosin umfasste den Kopfteil und ein kurzes Stück der  $\alpha$ -Helix und konnte über den Verdau mit Papain weiter in Subfragment S1 (Kopfbereich mit ATPase Aktivität) und Subfragment S2 aufgespalten werden (Kominz et al., 1965; Lowey et al., 1967; Lowey et al., 1969) (Abb. 2).



**Abb. 2: Schematische Darstellung des Typ II Myosin Hexamers.** Eine schwere Myosinkette besteht aus einem globulären Kopfbereich mit den Bindungsstellen für Aktin und ATP. Zudem der Halsregion, welche als Hebelarm fungiert und an die die leichten essentiellen bzw. regulatorischen Myosinketten (ELC bzw. RLC) nichtkovalent gebunden sind. Sowie einer  $\alpha$ -helikale Schwanzdomäne, die mit einem zweiten Myosin-Monomer dimerisiert. Somit umfasst ein Myosinmolekül als Hexamer zwei schwere und vier leichte Ketten. HMM – schweres Meromyosin, LMM – leichtes Meromyosin, S1 – Subfragment 1, S2 – Subfragment 2 (modifiziert nach Bresnick, 1999).

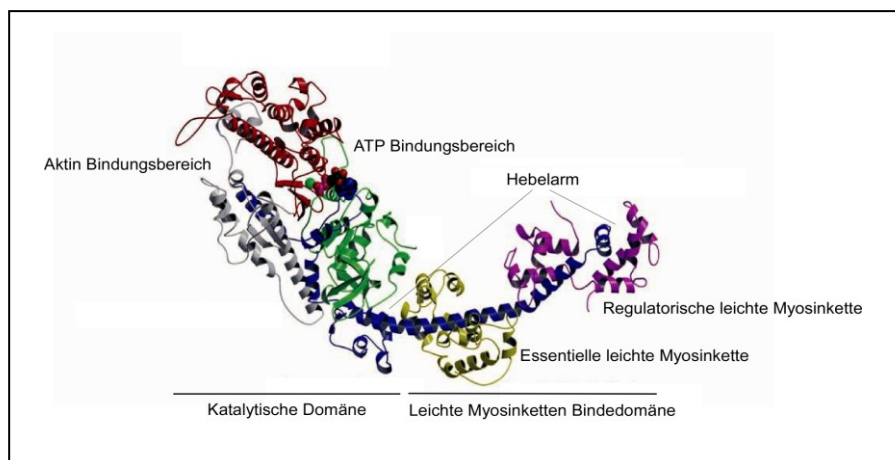
Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Typ II Myosin wird auch als „konventionelles“ Myosin bezeichnet. Es ist Hauptbestandteil der dicken Filamente in den Myofibrillen des Herzens und essentiell für die Muskelkontraktion. In einem Typ II Myosinmolekül bilden die Kopfregionen zweier schwerer Myosinketten (MyHC) zwei globuläre Domänen (Slayter et al., 1967), welche die ATPase-Domäne formen (AS 206 – 256) und die Aktin-Bindungsdomäne beinhalten (Huxley, 1963; Lowey et al., 1967). Dabei bindet jede MyHC in der Hals-Region, dem Hebelarm, eine essentielle leichte Myosinkette (ELC, IQ1) und eine regulatorische leichte Myosinkette (RLC, IQ2) (Lowey et al., 1971; Weeds et al., 1971). Die langen  $\alpha$ -helikalen Schwanzbereiche bilden einen *coiled-coil* (Craig et al., 2006). Somit ist Myosin Typ II ein Hexamer, bestehend aus zwei schweren (MyHC) und vier leichten, nichtkovalent gebundenen, Ketten (ELC, RLC) mit einem Molekulargewicht von 470 kDa.

Im humanen Herzen werden zwei verschiedene Myosin Typ II Gene exprimiert, welche für die beiden Isoformen  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -schwere Myosinkette kodieren und sich auf Chromosom 14p11.2-q13 befinden (Saez et al., 1987). Die humane  $\alpha$ -MyHC umfasst 1339 Aminosäuren (Matsuoka et al., 1991), während die  $\beta$ -MyHC aus 1335 Aminosäuren besteht (Jaenicke et al., 1990), wobei sich beide schweren Ketten in 131 Aminosäuren, zumeist in biologisch wichtigen Bereichen der S1-Region, wie der ATP- bzw. Aktin-Bindungsstelle oder dem Hebenarmbereich, unterscheiden (Schaub et al., 1998). Im gesunden Herzen werden beide Isoenzyme gewebespezifisch exprimiert. Im Atrium ist dabei die  $\alpha$ -MyHC Isoform bevorzugt vorhanden, während im Ventrikel fast ausschließlich die  $\beta$ -MyHC Isoform vorliegt. (Bouvagnet et al., 1984). Während im hypertrophierten Zustand größere Mengen  $\beta$ -MyHC im Atrium nachgewiesen werden können (Gorza et al., 1984), ist im humanen Ventrikel, sowohl im gesunden als auch hypertrophierten Zustand, kein oder kaum  $\alpha$ -MyHC vorhanden (Gorza et al., 1984; Ritter et al., 1999).

Die dreidimensionale Kristallstruktur des Myosin Subfragmentes S1 mit den leichten Myosinketten wurde am Skelettmuskel des Huhns von Rayment *et al.* 1993 beschrieben (Abb. 3). Sie besteht aus einer  $\alpha$ -helikalen schweren Kette (MyHC), welche am N-Terminus eine asymmetrische globuläre Kopfdomäne bildet. Dabei lassen sich als drei Hauptsegmente eine 25 kDa große N-terminale Domäne, eine zentrale 50 kDa große Domäne und eine 20 kDa große C-terminale Region unterscheiden. Die Bindungsstellen zu Aktin befinden sich in einer Spalte (*cleft*), welche die 50 kDa Domäne durchzieht. Gegenüberliegend, im Bereich des Überganges zwischen der 25 kDa zur 50 kDa Domäne, ist die ATP-Bindungsstelle, ebenfalls in Form einer offenen Tasche/Spalte, lokalisiert.

Die Aminosäuren 771 – 843 der MyHC formen die 8,5 nm lange  $\alpha$ -helikale Hals- bzw. Hebelarmregion mit den Bindungsstellen für die ELC (AS 783 – 806) und die RLC (AS 808 – 842). An diese sind die leichten Ketten über ein IQ-Motiv (IQxxxRGxxxR Konsensus-Sequenz) nichtkovalent gebunden (van der Waals Kräfte) (Rayment et al., 1993; Wendel et al., 2000). Eine sogenannte Konverter-Domäne verbindet die katalytische mit der Hals-Domäne (AS 711 – 771). Die Struktur der humanen kardialen ELC konnte von Rayment et al. 1993 und Houdusse et al. 2000 nicht vollständig geklärt werden, da es sich bei der von ihnen für die Kristallstruktur

verwendeten Isoform der ELC um die N-terminal 46 AS kürzere Spliceform (S1(A2)) des Proteins handelte. Im humanen Herzen ist dagegen ausschließlich die nicht gespligte, über die gesamte Länge exprimierte, Isoform (S1(A1)) vorhanden. In der in Abbildung 3 dargestellten 3D-Kristallstruktur des Kopf- / Halsbereich einer schweren Myosinkette mit den dazugehörigen leichten Myosinketten nach Rayment et al. 1993 fehlen die N-terminalen 46 Aminosäuren der essentiellen leichten Myosinkette des Herzens. Auf die genaue Struktur der humanen ELC wird in Kapitel 1.6 der Einleitung im größeren Detail eingegangen.



**Abb. 3: Kristallstruktur des Myosinkopfes und der Halsregion mit den essentiellen leichten Myosinketten (ELC, kurze Isoform) und den regulatorischen leichten Myosinketten (RLC).** Dargestellt sind die essentielle leichte Myosinkette (gelb) in der N-terminalen 46 AS verkürzten A2-Isoform, die regulatorische leichte Myosinkette (pink), ATP- und Aktin-Bindedomäne, die Halsregion (blau, Hebelarm) sowie die einzelnen proteolytischen Untereinheiten des Myosinkopfes (25 K N-Terminus (grün), obere 50 K Domäne (rot), untere 50 K Domäne (grau) (Rayment et al., 1993, modifiziert nach Geeves et al., 1999).

Zum jetzigen Zeitpunkt umfasst die Familie der Myosin-Proteine fünfunddreißig strukturell und funktionell unterscheidbare Klassen (Maravillas-Montero et al., 2011). Das humane Genom enthält nahezu vierzig Gene für Myosin, welche für zwölf dieser Klassen kodieren (Krendel et al., 2005). Myosin ist u.a. an verschiedenen Prozessen wie Zytokinese, Phagozytose, Stabilisierung der Zellform, Transport von Vesikeln (intrazellulärer Transport), Kontraktion und Bewegung (Berg et al., 2001, Coluccio, 2008) oder Signaltransduktion (Bähler, 2000) beteiligt. Einige Myosinklassen sind weit verbreitet, während andere nur in Pflanzen oder Vertebraten vorkommen (Berg et al., 2001, Thompson et al., 2002).

Die zyklische Interaktion von Aktin und Myosin ist Grundlage für die Verkürzung des Sarkomers durch das Ineinandergleiten der dicken und dünnen Filamente. Dabei wird angenommen, dass bei der Ausführung eines Querbrückenzyklus der Halsbereich der schweren Myosinkette als Hebelarm dient, welcher sich relativ zur katalytischen Domäne bewegt (Holmes, 1997). Beim Übergang von Typ II Myosinmolekülen in krafterzeugende Zustände lässt sich ein Shift in der ELC-Bindungsdomäne (Hebelarm), nicht jedoch direkt in der katalytischen Domäne, nachweisen (Irving et al., 1995; Lombardi et al., 1995). Weitere Untersuchungen mit verkürztem oder verlängertem Hebelarmbereich zeigten, dass die Gleitgeschwindigkeit der Aktinfilamente proportional zur Länge des Hebelarms ist (Uyeda et al., 1996). Beeinflussungen des Hebelarmbereiches z.B. durch das Entfernen der ELC führen zu einem Verlust der normalen Kraftentwicklung (VanBuren et al., 1994).

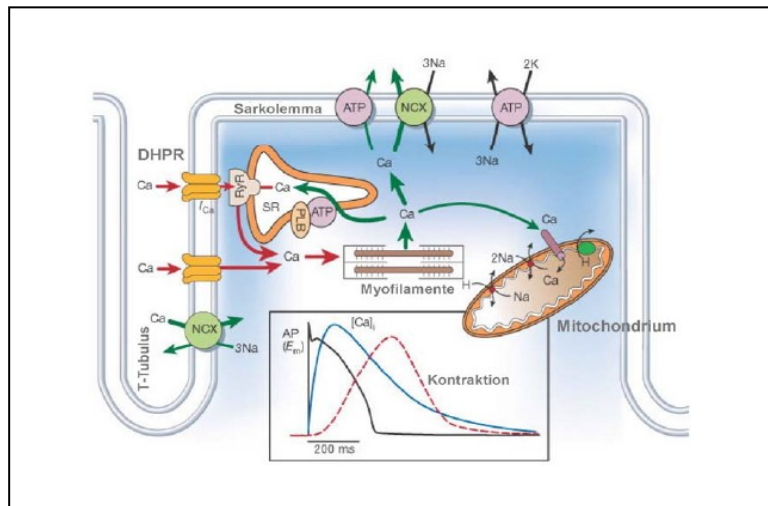
Aktin, der Interaktionspartner von Myosin im Querbrückenzyklus, tritt in zwei Formen auf: G-Aktin, welches ein globuläres Protein von etwas 42 kDa darstellt, und als faserförmiges F-Aktin, welches ein Polymer von G-Aktin ist (Straub, 1943). Dabei bindet das G-Aktin Monomer ATP und polymerisiert, unter Hydrolyse eines Phosphatrestes, mit weiteren Aktinmonomeren. Das Aktinfilament im Sarkomer besteht aus zwei Ketten polymerisierter F-Aktin Monomere in Form einer Doppelhelix (Holmes et al., 1990). Das für die Muskelkontraktion wichtige katalytische Zentrum des Aktomyosinkomplexes befindet sich im Myosinkopfbereich. Im intakten Muskel sind an das dünne Aktin-Filament zusätzlich Tropomyosin und Troponin (I, C, T) gebunden, welche in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  die Bindung zwischen Aktin und dem Myosinkopf verhindern (Spudich et al., 1972; Parry et al., 1973). Dabei interagiert jedes Tropomyosin-Molekül mit sieben Aktin-Monomeren des dünnen Filamentes und bindet einen Troponin Komplex (TnI, TnC, TnT) (Gordon et al., 2000)

### 1.3 Elektromechanische Kopplung

Die Herzmuskulatur stellt eine spezielle Form der quergestreiften Muskulatur dar. Im Gegensatz zum Skelettmuskel, welcher durch erregende Motoaxone innerviert wird (somatisches Nervensystem), erfolgt die Innervation der Herzmuskulatur über einen spontanen myogenen Schrittmacher im rechten Vorhof des Herzens (Sinusknoten).



Neurone des sympathischen und parasympathischen Teils des vegetativen Nervensystems besitzen nur modulatorische Funktionen (Mitchell, 1953). Die im Sinusknoten ausgelöste elektrische Erregung gelangt über die Atrien zum Atrioventrikularknoten, dem einzigen Punkt, an dem eine Überleitung zwischen Vorhöfen und Kammern möglich ist. Von dort wird sie über die His-Bündel und Purkinje Fasern im Ventrikel weitergeleitet, so dass eine kontrollierte Kontraktion des Herzens (Systole) mit anschließender Relaxation (Diastole) erfolgt (Rubart et al., 2005). Aneinander grenzende Kardiomyozyten sind dabei mechanisch und elektrisch über Verzweigungen und Glanzstreifen (*intercalated disc*) gekoppelt. Diese bestehen überwiegend aus Desmosomen, *tight junctions* (mechanischer Zusammenhalt) und *gap junctions* (Erregungsleitung) (Fawcett et al., 1969). Das Aktionspotential (AP) des Herzens unterscheidet sich von dem des Skelettmuskels durch eine Plateau-Phase zwischen dem Initialpeak und der Repolarisationsphase und beträgt um die 250 ms (Bers et al., 2002). Dabei führt das AP zum Öffnen von  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen in der Zellmembran. Durch das Einstromen von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  wird die Freisetzung von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem sarkoplasmatischen Retikulum über Ryanodinrezeptoren (RyR) ausgelöst (diFrancesco et al., 1985) (Abb. 4). Die über die Membrandepolarisation eingeleitete Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  ( *$\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release*) und die dadurch ausgelöste Myofilamentbewegung werden als elektromechanische-Kopplung bezeichnet. Ein Anstieg der freien zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von einem diastolischen Ruhewert von etwa  $0,1 \mu\text{M}$  auf circa  $1 \mu\text{M}$  aktiviert die Myozytenkontraktion (Bers et al., 2002). Aufgrund der Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an die N-terminale Region von Troponin C kommt es zu einer Veränderung der Konformation im Protein, woraufhin auch Tropomyosin seine Position auf dem Aktinfilament ändert. Erst durch diesen Schritt wird eine krafterzeugende Aktin-Myosin-Interaktion möglich (Solaro et al., 1996). Über eine Reduzierung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration durch  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen in Sarkolemma und im sarkoplasmatischen Retikulum,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher im Sarkolemma und die Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  in Mitochondrien kommt es in der Diastole zur Relaxation (Bers et al., 2002) (Abb. 4).

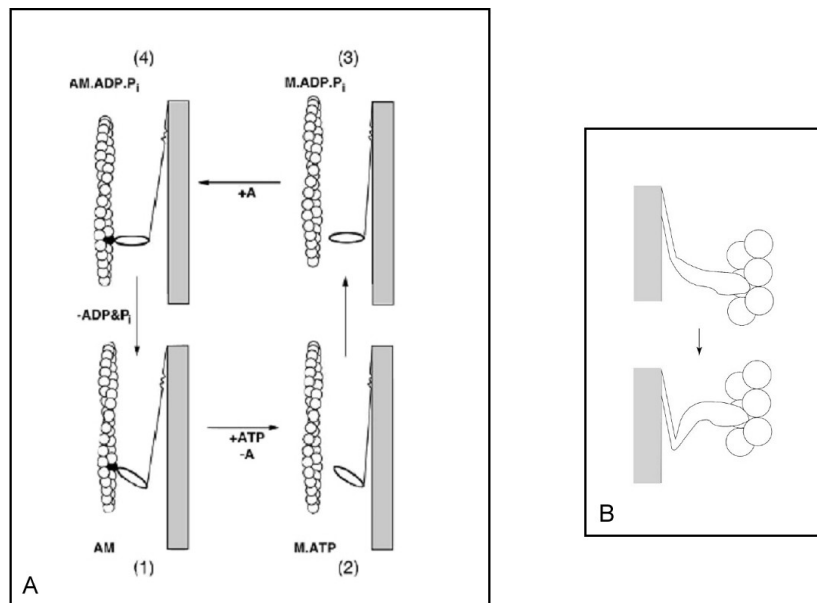


**Abb. 4: Schematische Darstellung des Kalziumtransportes in einer Kardiomyozyte nach einem AP.** Einstrom von extrazellulärem Ca<sup>2+</sup> in die Kardiomyozyte mit dadurch ausgelöster Freisetzung von intrazellulärem Ca<sup>2+</sup> aus dem SR sowie Rücktransport des Ca<sup>2+</sup>. Kleines Insert: Zeitverlauf von Aktionspotential (AP) mit nachfolgendem intrazellulärem Ca<sup>2+</sup>-Anstieg und resultierender Kontraktion der Myozyte. NCX – Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Austauscher, PLB – Phospholamban, DHPR – Dihydropyridinrezeptor, SR – Sarkoplasmatisches Retikulum, RyR – Ryanodinrezeptor (modifiziert nach Bers, 2002).

### 1.4 Gleitfilamenttheorie und Querbrückenzyklus

Die Kontraktion und Kraftentwicklung eines Muskels erfolgt über das Verkürzen von Sarkomeren. Diese resultiert nicht aus einer Längenänderung der dicken oder dünnen Filamente, sondern entsteht durch das Ineinandergleiten von Aktin- und Myosinfilamenten, wobei sich die Aktinfilamente Richtung Sarkomermitte bewegen (Gleitfilamenttheorie). Dabei nähern sich die Z-Scheiben einander an, während die A-Bande konstant bleibt (Huxley, 1957). Die Filamentbewegung beruht hierbei auf der zyklischen Interaktion der Kopfdomäne des Typ II Myosin mit den benachbarten Aktinfilamenten (Geeves et al., 1999) (Abb. 5A). Nach Beendigung eines Querbrückenzyklus bzw. zu Beginn des nachfolgenden Zyklus liegt Myosin ohne ATP-Molekül an Aktin gebunden vor (Rigor-Zustand). Die Bindung eines neuen ATP-Moleküls in der katalytischen Domäne des Myosinkopfes führt zur Reduzierung der Affinität zwischen Aktin und Myosin und zum Ablösen des Myosinkopfes vom Aktinfilament. Die Hydrolyse von ATP zu ADP und P<sub>i</sub> löst eine Konformationsänderung im Hebelarmbereich in eine 90° Position (Pre-Power-Stroke-Konformation) aus, wobei die Hydrolyseprodukte an Myosin gebunden bleiben. Der Myosinkopf geht, bei Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup>, eine zunächst schwache Bindung zum Aktinfilament ein. Über die Freisetzung von P<sub>i</sub> erfolgt der Wechsel zwischen

schwacher, nicht krafterzeugender Bindung ( $AM \cdot ADP \cdot P_i$ ) und starker, krafterzeugender Bindung ( $AM \cdot ADP$ ) von Myosin und Aktin (Gordon et al., 2001). Die Freisetzung der Hydrolyseprodukte triggert die Konformationsänderung und das Umklappen des Hebelarms in die  $45^\circ$  Position (Post-Power-Stroke-Konformation) und bewegt so die dünnen Filamente in Richtung Sarkomermitte (Cooke, 1986; Spudich et al., 1995) (Abb. 5B). Erst die Bindung eines neuen ATP-Moleküls im katalytischen Zentrum des Myosinkopfes löst Myosin vom Aktinfilament ab (Geeves et al., 2005).

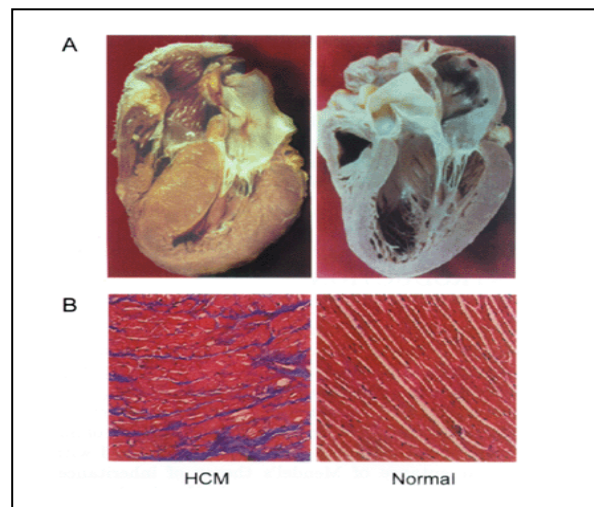


**Abb. 5: Lymn-Taylor-Zyklus (A) und Hebelarmbewegung (B).** A) A – Aktin, AM – Aktomyosinkomplex, M.ATP – Myosin mit gebundenem ATP, M.ADP. $P_i$  – Myosin mit hydrolysiertem ATP (zu ADP +  $P_i$ ), AM.ADP. $P_i$  – Aktomyosinkomplex mit ADP und  $P_i$ . (1) Myosin ist an Aktin im  $45^\circ$  Winkel gebunden (*down position*, Rigor-Zustand). ATP bindet an Myosin, was zur schnellen Dissoziation von Aktin führt (2). Die Hydrolyse von ATP zu ADP und  $P_i$  führt zur Konformationsänderung des Myosinkopfes in die  $90^\circ$  *up position* (3) und erst danach wieder zur Bindung an Aktin (4). Nach dem Binden an Aktin erfolgt eine Konformationsänderung, welche die Freisetzung der Hydrolyseprodukte und die Filamentbewegung (*power stroke*) ermöglicht (4→1) (Lymn et al., 1971). B) Die Konformationsänderung erfolgt im distalen Bereich der Querbrücke im sogenannten Hebelarm (Cooke, 1986).

## 1.6 Die hypertrophe Kardiomyopathie

Hypertrophien des Herzens können durch Erkrankungen wie arterielle Hypertonie, Klappen- oder Septumsdefekte, entzündliche Prozesse, endokrine Erkrankungen oder, wie im Fall der familiären hypertrophen Kardiomyopathie (fHCM), kongenital, durch Mutationen in Sarkomerproteinen ausgelöst werden. Familiäre HCM ist eine häufig auftretende Erkrankung des Herzens (1:500). Sie ist durch eine Hypertrophie

des linken Ventrikels, in manchen Fällen auch des interventrikulären Septums, charakterisiert, wobei eine Septumhypertrophie zur Obstruktion der Ausflussbahn (Aorta) führen kann (HOCM – Hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie). Die Hypertrophie erfolgt über die Vergrößerung der einzelnen Kardiomyozyten, nicht über ihre Vermehrung. Störungen im Aufbau der Myofibrillenstruktur, Herzrhythmusstörungen und eine Zunahme des interstitiellen Bindegewebes (Fibrose) sind typische Erscheinungen der HCM (Hughes et al., 2005; Maron et al., 2003a; Maron et al., 1995) (Abb. 6). Ein Fortschreiten der Erkrankung ist oftmals mit der Entstehung einer Herzinsuffizienz verbunden. Klinisch können leichte bis schwere Manifestationen der HCM auftreten. Typische Symptome bei Patienten sind Leistungsminderung, Müdigkeit, Brustschmerzen, Atemnot, Arrhythmien und seltener Ohnmachtsanfälle (Maron, 1997). Hypertrophe Kardiomyopathie gehört zu den häufigsten Gründen des plötzlichen Herztodes bei Personen unter 35 Jahren (Maron et al., 1983; Spirito et al., 2001; Maron, 2003b).



**Abb. 6: Normales und hypertrophiertes Herz.** A) links – Herz mit massiver asymmetrischer linksventrikulärer Hypertrophie und verringertem Kammervolumen, rechts – normales Herz. B) Gewebeschnitt mit Masson-Trichrom-Färbung. links – fibrotische Veränderungen, rechts – Gewebeschnitt eines gesunden Herzens (Chung et al., 2003).

Die mit der HCM assoziierten Mutationen werden autosomal-dominant vererbt. Dabei handelt es sich um Mutationen in Genen, die für Proteine des Sarkomers kodieren. Bis heute sind nahezu 900 verschiedene Mutationen in 9 sarkomerkodierenden Genen identifiziert worden (Konno et al., 2011, Siegert et al., 2011). Dazu zählen u.a. Mutationen in der beta-schweren Myosinkette (MYH7), dem Myosin Bindungsprotein C (MYPBC3), Troponin T (TNNT2), Troponin I (TNNI3), Aktin

(ACTC), alpha-Tropomyosin (TPM1), Myomesin (MYOM 1) und der essentiellen (MYL3) beziehungsweise regulatorischen (MYL2) leichten Myosinkette (Morita et al., 2008, Konno et al., 2011). Darunter stellen Mutationen in MYL7 und MYPBC3, mit ungefähr 50 % aller HCM Fälle, die am häufigsten betroffenen Gene dar. Mutationen in TNNT2, TNNI3, ACTC, TPM1, MYL3 und MYL2 machen zusammen weniger als 20 % aus (Bos et al., 2009). Durch genetische Analysen in Familien von Patienten mit HCM konnte in rund 60 % aller Fälle die familiäre Vererbung einer Mutation in einem Sarkomerprotein nachgewiesen werden (Richard et al., 2003). Bei den restlichen Erkrankungen handelt es sich wahrscheinlich um nicht erkannte Familienerkrankungen, bei denen z.B. die entsprechende Gen-Mutation noch nicht bestimmt werden konnte oder die Familiegröße für derartige Untersuchungen unzureichend ist. Die meisten HCM-Mutationen beruhen auf Missense-Mutationen oder Deletionen. Momentan werden verschiedene Mechanismen für die Veränderung von Struktur und Funktion des Sarkomers durch diese Mutationen diskutiert (van Dijk et al., 2009; Tripathi et al., 2011; Bonne et al., 1998; Seidman et al., 2001; Hernandez et al., 2005; Volkmann et al., 2007).

Die Genotyp-Phänotyp-Korrelation, d.h. die Beziehung zwischen HCM-Mutation und klinischem Erkrankungsbild, ist bisher kaum geklärt. Jedoch ist bekannt, dass bestimmte Mutationen mit schweren bzw. leichten Verläufen der HCM assoziiert sind. So werden z.B. bestimmte Mutationen im MYH7 Gen von einer besonders schweren Form der Kardiomyopathie begleitet (Marian et al., 1998, Ackerman et al., 2002). Zusätzlich scheinen die Anzahl der mutierten Gene, die Menge des mutierten Proteins (hetero-/homozygote Mutation) (Mohiddin et al., 2003), sogenannte *modifier-genes* (Brugada et al., 1997) und das Geschlecht, Umwelt bzw. die Lebenssituation einen Einfluss auf den Verlauf und die Ausprägung der Erkrankung zu haben (Maron et al., 2003a; Perkins et al., 2005; Bos et al., 2008). In verschiedenen Studien konnten, in Abhängigkeit von der spezifischen Mutation, sowohl Verbesserungen in den untersuchten Parametern (*gain of function*) als auch Verschlechterungen (*loss of function*) beobachtet werden (Palmiter et al., 2000; Keller et al., 2004; Tardiff, 2005; Ferrantini et al., 2009).

### 1.6 Die humane essentielle ventrikuläre leichte Myosinkette

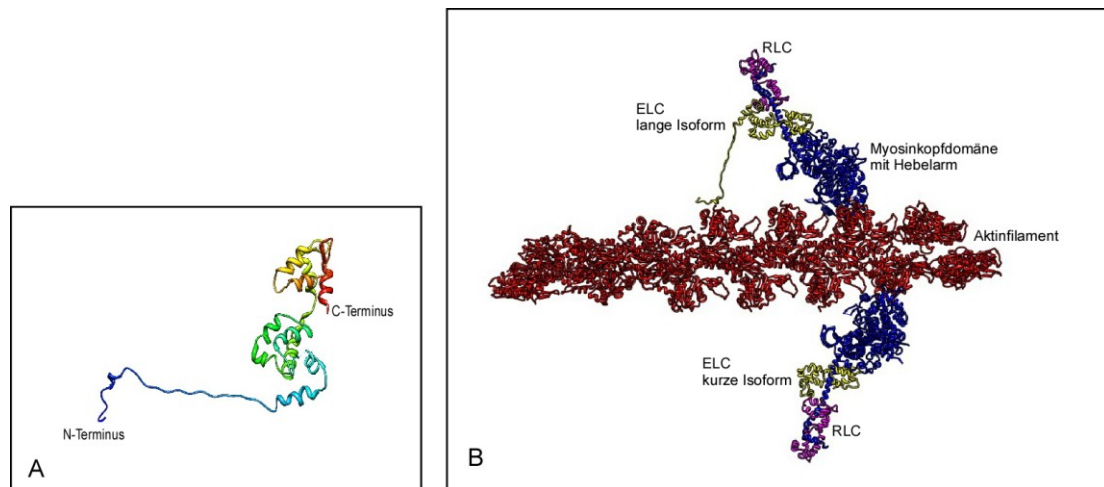
Leichte Myosinketten (MLC) sind Bestandteile des Typ II Myosinmoleküls. 1953 wurde erstmals von Tsao die Existenz kleinerer Untereinheiten von Myosin nachgewiesen. Die Behandlung von Myosin mit Urea führte zur Bildung von Komponenten mit geringerem und höherem Molekulargewicht (Tsao, 1953). Die Aufbereitung von Myosin mit Alkali (Lauge) (Kominz et al., 1959), Lithium Chlorid (LiCl) (Stracher, 1969), Guanidin Hydrochlorid (GdnHCl) (Dreizen et al., 1967) oder Denaturierung mit Hitze (Locker, 1956) führte zur Dissoziation einer leichten Myosinkette und dem Verlust der ATPase Aktivität des restlichen Myosins. Diese Klasse der leichten Ketten wurde daher als „essentielle leichte Myosinketten (ELC)“ oder Alkali-leichte-Ketten bezeichnet, weil sie als notwendig für die ATPase Aktivität des Moleküls angesehen wurde. Eine zweite Form leichter Ketten, welche auch phosphoryliert vorliegen konnte (Perrie et al., 1972), wurde ohne den Verlust der ATPase Aktivität, mittels 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic Säure) (DTNB), vom Myosin getrennt (Gazith et al., 1970; Weeds et al., 1971). Diese Ketten wurden als „regulatorische leichte Myosinketten (RLC)“ oder DTND-leichte-Ketten bezeichnet. In späteren Studien konnte nachgewiesen werden, dass die ELC nicht essentiell für die ATPase Aktivität des Myosinmoleküls ist. Die MyHC ohne essentielle leichte Ketten zeigte normale  $\text{Ca}^{2+}$  und ATPase Aktivitäten sowohl im Skelett- (Wagner et al., 1981; Sivaramakrishnan et al., 1982) als auch im Herzmuskel (Mathern et al., 1986). Die Nomenklatur wurde jedoch beibehalten.

Präpariertes Myosin schneller Skelettmuskelfasern zeigt im SDS-Gel drei leichte Ketten mit verschiedenen Molekulargewichten (25 kDa, 18 kDa, 16 kDa) (Weeds et al., 1971). Die 25 kDa (A1) und die 16 kDa (A2) Isoformen der MLC werden von einem Gen, jedoch mit separaten Promotern und alternativem Splicen, codiert. Der A2-Form fehlen dabei die 41 N-terminalen Aminosäuren (Frank et al., 1974; Nabeshima et al., 1984; Periasamy et al., 1984). Im langsamen Skelettmuskel und im Herzen lassen sich zwei MLC mit 27 kDa bzw. 18 kDa nachweisen (Lowey et al., 1971; Sarkar et al., 1971). Dabei entspricht die essentielle leichte Myosinkette mit 27 kDa der ungesplittenen A1-Isoform und die regulatorische leichte Myosinkette der 18 kDa MLC (Weeds et al., 1971, Lowey et al., 1971).

Zusammen mit Calmodulin und Troponin C gehören die essentiellen leichten Myosinketten in die Familie der EF-Hand  $\text{Ca}^{2+}$  bindenden Proteine. Die ELC besitzt vier EF-Hand Motive, welche jeweils aus einer Helix-Loop-Helix Region bestehen (Moncrief et al., 1990). Das zweite EF-Hand-Motiv der ELC wird dabei mit dem isoformspezifischen Einbau in Verbindung gebracht (Kahn et al., 2001). Die essentiellen leichten Ketten der Säugetiere binden jedoch kein  $\text{Ca}^{2+}$  mehr. Als zwei potentielle Phosphorylierungsstellen wurden die Aminosäuren Thr64 und Ser194/195 beschrieben (Arrell et al., 2001).

Im humanen Herzen werden zwei verschiedene essentielle leichte Myosinketten-Gene gewebespezifisch im Atrium (MYL4-Gen, hALC1) bzw. im Ventrikel (MYL3-Gen, hVLC1) exprimiert (Kurabayashi et al., 1988). Das Gen für die humane ventrikuläre ELC Isoform des Myokards (MYL3) ist auf Chromosom 3p21.3-p21.1 lokalisiert und besteht aus sieben Exons, die für ein 195 AS großes Protein kodieren (Fodor et al., 1989). Die Aminosäuresequenz der essentiellen ventrikulären leichten Myosinketten ist stark konserviert (Hernandez *et. al.*, 2007). Die Expression der hVLC1 ist im gesunden Zustand auf den Ventrikel beschränkt (Schiaffino et al., 1996). Bei verschiedenen Erkrankungen des Herzens, wie HCM oder DCM, kommt es jedoch zur zusätzlichen Expression von hALC im Ventrikel (Morano et al., 1996, Abdelaziz et al., 2005). Es wird davon ausgegangen, dass sich unter physiologischen Bedingungen die ELC und die schwere Myosinkette in einem Assoziations-Dissoziations-Gleichgewicht befinden (Zaager et al., 1988).

In der 2007 publizierte Studie von Aydt et al. wurde erstmals die lange ungespaltene Isoform der ELC, d.h. die fehlenden N-terminalen Aminosäuren, modelliert. Dabei besteht die N-terminale ELC-Domäne aus einem repetitiven Alanin-Prolin reichen Segment (AS 15 – 28) sowie einem lysinreichen, geladenen *sticky end* N-Terminus (AS 1 – 15). Die postulierte 3D Struktur der 91 Angström großen N-terminalen 46 AS der ELC lässt einen Kontakt zwischen ELC und dünnem Aktinfilament zu (Aydt et al., 2007) (Abb.7).



**Abb. 7: Darstellung der N-terminalen 46 Aminosäuren der langen ELC Isoform im 3D-Modell.** A) Modellierung der langen ELC Isoform mit den bisher fehlenden 46 N-terminalen Aminosäuren (MLE1\_Chick) B) 3D-Modell des Akto-Myosin-Komplexes. Benachbarte Aktin-Einheiten sind in rot, Myosin-S1-Kopf-Region in blau, regulatorische leichte Myosinkette in magenta dargestellt. Die essentielle leichte Myosinkette der kurzen Isoform nach Rayment et al., 1993 ist am unteren Myosin-S1 in gelb, die lange ELC Isoform nach Ayed et al., 2007 mit den modellierten 46 N-terminalen Aminosäuren am oberen Myosin-S1 ebenfalls in gelb dargestellt.

Neben der Bindung an die schwere Myosinkette konnte zusätzlich eine Bindung des N-Terminus der ELC an C-terminale saure Aminosäuren von Aktin (AS 360 – 364) nachgewiesen werden (Sutoh, 1982; Trayer et al., 1987; Stepkowski, 1995). Die ELC stellt damit eine weitere Bindung zwischen MyHC und Aktin dar. Die Hemmung der ELC/Aktin Interaktion führt zu einer erhöhten Kraftentwicklung und ATPase Aktivität (Morano *et. al.* 1995; Rarick et al., 1996). Die Bindung zwischen dem N-Terminus der langen ELC Isoform und Aktin wird dementsprechend mit einer verlangsamten Myosin-Motorfunktion assoziiert (Timson et al., 1998; Sweeney, 1995; Moore et al., 2000) und der ELC die Funktion eines MyHC/Aktin-*tethers* zugeschrieben (Morano, 1999).

Die Funktion des Myosinkopfes als katalytische Domäne bzw. molekularer Motor wird über die ELC maßgeblich reguliert und modifiziert (Morano et al., 1995; Timson et al., 1998). Obwohl die ELC nicht essentiell für ATPase Aktivität der MyHC ist, spielt sie eine wichtige Rolle während der Kontraktion, wie in mehreren Studien nachgewiesen werden konnte. So führte in *in vitro motility*-Assays mit Myosin von Skelettfasern (M. pectoralis) vom Huhn die Entfernung der leichten Ketten zu einer signifikanten Reduzierung der Aktinfilament-Bewegung (Lowey et al., 1993). Die



Kraftentwicklung in Muskelfasern verringerte sich nach Entfernen der essentiellen leichten Myosinketten um etwa 50 % (VanBuren et al., 1994). Auch im Zebrafischmodell zeigte eine C-terminal trunkierte Form der ELC eine deutlich verschlechterte Herzfunktion (Meder et al., 2009). Eine, der gesplitten Isoform (A2) nachempfundene, N-terminale 43 AS trunkierte hVLC1 führte in einer Studie von Kazmierczak et al. 2009 im transgenen Mausmodell zu einer reduzierten Kraftentwicklung in Myofibrillen. Für die normale Kraftentwicklung des Myosinmoleküls ist somit die ELC von maßgeblicher Bedeutung (Hernandez et al., 2007).

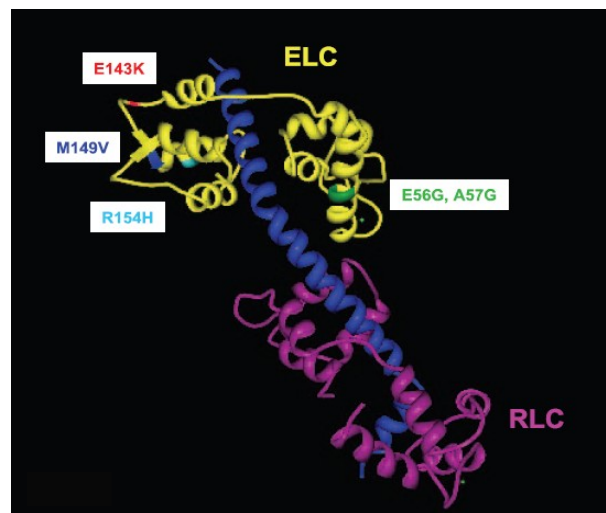
Die Modulierung und das *fine-tuning* der Muskelkontraktion wird dabei vermutlich über die verschiedenen Isoformen der ELC (A1-A2, VLC-ALC) realisiert. So sind die über Aktin aktivierte ATPase Aktivitäten der A1- bzw. A2-Isoformen der ELC verschieden. Unter schwacher Ionenstärke ist die benötigte Konzentration an Aktin für die halbmaximale Aktivierung der ATPase Aktivität des Myosin-S1 für S1(A1) deutlich geringer als für S1(A2) (Weeds et al., 1975; Chalovich et al., 1984). Zudem ist die maximale Zyklusanzahl (Querbrückenzyklen) bei S1(A2) höher als bei S1(A1) (Weeds et al., 1975). Gleiches gilt für die Aktinfilamentbewegung (Lowey et al., 1993). Die partielle Substitution der hVLC1 durch hALC führte zu gesteigerter Querbrückenfunktion chemisch gehäuteter Herzmuskelfasern (Morano et al., 1996; Morano et al., 1997). Ein transgenes Tiermodell (hVLC1→hALC1 im Ventrikel) zeigte ebenfalls eine verbesserte Herzfunktion (Fewell et al., 1998). Diese wichtige modulatorische Bedeutung der ELC-Isoformen könnte über einen Einfluss auf die Federkonstante, d.h. die Steifheit, des Hebelarms vermittelt werden (Uyeda et al., 1996, Morano et al. 1999).

### 1.7 Mutationen im MYL3 Gen

Die ersten mit hypertropher Kardiomyopathie assoziierten Missense-Mutationen im hVLC1 Gen (MYL3, NP\_000249.1) M149V und R154H wurden von Poetter et al. 1996 beschrieben. Zusätzlich sind die Mutationen A57G (Lee et al., 2001), E143K (Olson et al., 2002) und E56G (Richard et al., 2003) publiziert (Abb. 8 und 9). Alle Mutationen treten in konservierten Bereichen des MYL3-Gens auf und erzeugen

unterschiedliche HCM-Phänotypen (Hernandez et al., 2007). Von keiner dieser fünf Mutationen ist momentan der Pathomechanismus bekannt.

Des Weiteren sind im MYL3-Gen die H155D und E152K Mutationen identifiziert worden (Kaski et al., 2009), welche jedoch nicht Teil meiner Arbeit waren, da sie erst zu einem späteren Zeitpunkt publiziert wurden.



**Abb. 8: 3-Dimensionale Lokalisation der untersuchten HCM-Mutationen der essentiellen leichten Myosinkette.** Blau – Hebelarmbereich der schweren Myosinkette ohne Kopf- und Schwanzbereich, RLC (lila) – regulatorische leichte Myosinkette, ELC (gelb) – kurze Darstellungsform der essentiellen leichten Myosinkette (A2) mit der Lokalisation der Mutationen E56G, A57G, E143K, M149V und R154H basierend auf der Kristallstruktur von Muschel-Myosin (modifiziert nach Houdusse et al., 1996 und Hernandez et al., 2007).

Die 1996 von Poetter et al. beschriebenen Mutationen Met149Val und Arg154His sind im Exon 4 des hVLC1 Genes lokalisiert. Entsprechend der Kristallstruktur von Houdusse et al. 1996 befindet sich die M149V Mutation in der  $\beta$ -Faltblatt-COOH-Region des Loops bzw. die R154H Mutation am Ende des Loops im dritten EF-Hand Motiv des Proteins. Die M149V Mutation wurde bei einem DNA-Screening von 383 nicht verwandten Patienten mit HCM in einer Familie nachgewiesen. Sechs von dreizehn Trägern der Mutation zeigten einen seltenen Hypertrophietyp der linken Ventrikelmitte aufgrund von Septums- und Papillarmuskelverdickungen (Poetter et al., 1996). Ein an Patientenmaterial (Herzbiopsien) durchgeführtes *in vitro motility*-Assay ergab einen 40 %igen Anstieg der Translokation von Aktinfilamenten auf M149V-Myosin beschichteten Oberflächen. Als mögliche Gründe wurden eine erhöhte Schrittgröße des Myosinkopfes pro Querbrückenzyklus, ein gesteigerter Arbeitszyklus oder eine verstärkte ATPase Aktivität von den Autoren diskutiert (Epstein, 1998). Des Weiteren konnte die M149V Mutation in einer weiteren Studie

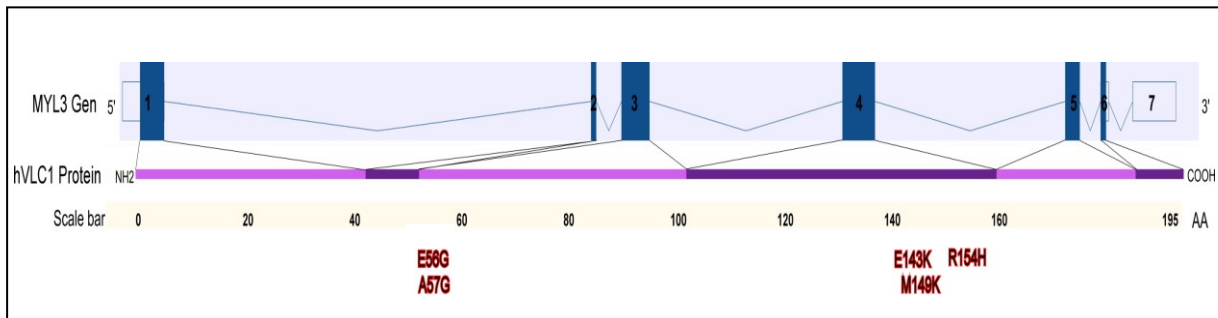
von Arad et al. 2005 in einer Familie mit apikaler Hypertrophie nachgewiesen werden.

Die ebenfalls im Rahmen der Studie von Poetter et al. 1996 dokumentierte Arg154His Mutation wurde in einem Kind mit stark obstruktiver, linksventrikulärer Ventrikelhypertrophie beschrieben. Es sind keine weiteren Informationen zu dieser Mutation oder der Patientenfamilie bekannt.

Bei der von Lee et al. 2001 publizierte Arbeit konnte die Ala57Gly Mutation in Exon 3 des MYL3-Gens in zwei nicht verwandten koreanischen Familien und einem japanischen Patienten mit HCM nachgewiesen werden. Die Mutation ist in der  $\alpha$ -Helix des ersten EF-Hand Motivs und damit in der MyHC-Bindedomäne lokalisiert. Der Phänotyp der Erkrankung entspricht der klassischen asymmetrischen Septumhypertrophie mit unterschiedlicher Penetranz in den betroffenen Personen. Zumeist zeigten erst Erwachsene phänotypische Symptome, jedoch bestand ein erhöhtes Risiko für einen plötzlichen Herztod bei jugendlichen Mutationsträgern.

In der von Olson et al. 2002 veröffentlichten Studie konnte bei einem jungen Indexpatienten im DNA-Screening die Glu143Lys Mutation als homozygote Variante in Exon 4, im Bereich des Loops des dritten EF-Hand Motives, dokumentiert werden. Zwei jüngere Geschwister waren zuvor am plötzlichen Herztod verstorben. Der Phänotyp entsprach einer Hypertrophie der linken Ventrikelmitte und des Apex (Herzspitze) mit leichter Obstruktion der Aufwurfbahn und Veränderungen im EKG (Elektrokardiogramm). Beide Eltern und eine weitere Schwester waren heterozygot für die E143K Mutation und zeigten keine Symptome. Da kein intermediärer Phänotyp für die heterozygoten Mutationsträger nachgewiesen werden konnte, wurde von den Autoren eine rezessive Vererbungsform der HCM postuliert.

Die von Richard et al. 2003 im Rahmen eines Mutationsscreenings von 197 nicht verwandten Patienten mit sporadischer oder familiärer HCM beschriebene Mutation Glu56Gly trat in Exon 3 des hVLC1 Genes auf. Auf Basis der 3D-Kristallstruktur (Houdusse et al., 1996) konnten die Mutationen in der  $\alpha$ -Helix des ersten EF-Hand Motivs lokalisiert werden, was der Bindedomäne zur MyHC entspricht. Weitere klinische Informationen zum Phänotyp, Verlauf der Erkrankung oder zur Familie des Probanden sind nicht verfügbar.



**Abb. 9: Schematische Darstellung des MYL3 Gens (oben) bzw. des hVLC1 Proteins (unten) mit den fünf Mutationen E56G, A57G, E143K, M149V und R154H.** Oben: MYL3 Gen, 7 Exons (blaue Rechtecke = translatierte Bereiche, ungefüllte Rechtecke = nicht translatierte Bereiche vor Start- bzw. nach Stopcodon) mit den dazwischen liegenden Introns (blaue Striche). Unten: Gesamtes hVLC1 Protein mit N- (NH<sub>2</sub>) und C- (COOH) Terminus (hell-/dunkel-violett) bestehend aus 195 Aminosäuren. Angegeben sind zusätzlich die fünf Mutationen bezogen auf das Protein (modifiziert nach Vega-Sanger-Blast).

Sowohl die M149V als auch die A57G Mutation im MYL3 Gen wurden in transgenen Tiermodellen näher untersucht. Für die M149V Mutation existieren zwei transgene Mausmodelle (Vemuri et al., 1999; Sanbe et al., 2000) sowie ein Kaninchenmodell (James et al., 2002). Während in der Arbeit von Vemuri et al. 1999 mit der Überexpression der mutierten humanen leichten Myosinkette (hVLC1<sup>M149V</sup>) in der Maus der hypertrophe Phänotyp rekapituliert werden konnte, war die Expression der murinen leichten Kette mit der M149V Mutation im Mausmodell (mVLC1<sup>M149V</sup>) von Sanbe et al. 2000 mit keinen morphologischen Veränderungen im Herzen verbunden. In der Arbeit von James et al. 2002 mit M149V mutierter Kaninchen-VLC1 (*rabbitVLC1*<sup>M149V</sup>) konnte ebenfalls kein hypertropher Phänotyp beobachtet werden. Der fehlende Phänotyp der Tiermodelle von Sanbe et al. 2000 und James et al. 2002 belegt die inzwischen bekannte Tatsache, dass eine, in einer bestimmten Spezies krankheitsauslösende, Genveränderung nicht zwangsläufig speziesübergreifend wirken muss (Bronson et al., 1996; Vemuri et al., 1999).

Die im September 2011 erfolgte die Publikation von Muthu et al. hatte die A57G Mutation im transgenen Mausmodell zum Thema. Der Aminosäureaustausch von Alanin zu Glycin an Position 57 der leichten Myosinkette führte zu einem verringerten Abstand der Myosinfilamente untereinander (*reduced interfilament spacing*) und erhöhter Steifheit von A57G Papillarmuskelfasern. Zusätzlich konnte Muthu et al. 2011 in Gewebeschnitten des linken Ventrikels 10 - 12 Monate alter männlicher Tiere

Fibrose und Störungen im Aufbau der Myofibrillenstruktur nachweisen. Die Tiere zeigten jedoch keine Anzeichen einer Hypertrophie.

### 1.8 Fragestellung

Herzversagen aufgrund von hypertropher Kardiomyopathie zählt mit 1:500 Betroffenen zu den häufigen Erkrankungen in der westlichen Welt (Maron et al., 2003a). Auslöser der Hypertrophie können autosomal-dominante Mutationen in für die Kontraktion zuständigen Sarkomerproteinen sein. Die molekularen und pathogenetischen Mechanismen für diese Veränderungen sind momentan noch nicht vollständig bekannt. Die Schwere des Krankheitsbildes ist neben Umweltfaktoren und modifizierenden Genen auch davon beeinflusst, welches Sarkomer-Gen von der Mutation betroffen ist. So sind schwere Formen der HCM, mit Komplikationen wie dem plötzlichen Herztod, oft mit Mutationen in bestimmten Genen assoziiert.

Ausgangspunkt meiner vorliegenden Arbeit waren fünf publizierte Mutationen (E56G, A57G, E143K, M149V, R154H) der essentiellen leichten ventrikulären Myosinkette (hVLC1), welche mit verschiedenen Formen und Schweregraden der HCM assoziierten. Dabei stellte sich für die Arbeit nicht nur die Frage nach dem Pathomechanismus, durch den die MYL3-Mutationen den HCM Phänotyp auslösen. Zielsetzung war zudem, die Auswirkungen der Mutationen auf Proteinstruktur und Funktion zu untersuchen. Hat das dysfunktionale Protein andere strukturelle und/oder funktionelle Eigenschaften? Sind die Veränderungen durch die Mutationen mit einer Verbesserung (*gain of function*) oder Verschlechterung (*loss of function*) der Myosinfunktion und damit der kontraktile Parameter verbunden? Besteht ein Mangel an normalem Protein (Haploinsuffizienz) oder führt das Zusammenwirken von mutiertem und normalem Protein zu einem dominant-negativen Effekt?

Die Sekundärstruktur der normalen und mutierten hVLC1 wurde über CD-Spektren, Schmelzkurven und *fluorescence lifetime imaging microscopy* (FLIM) untersucht, um Modifikationen in der Proteinstruktur nachzuweisen. Weiterhin wurden Protein-Protein-Bindungsstudien zwischen der normalen bzw. den mutierten leichten hVLC1 und der schweren Myosinkette, mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz, durchgeführt. Auftretende Veränderungen der Affinität des hVLC1/MyHC Komplexes durch eine Mutation wurden im Sorting Assay in neonatalen Kardiomyozyten weiter

untersucht. Ferner wurde für funktionelle *in vivo* und *in vitro* Versuche erstmals eine transgene Mauslinie für die E56G Mutation etabliert und charakterisiert, welche die normale bzw. mutierte hVLC1 Form gewebespezifisch im Herzen exprimiert und gegen die endogene murine VLC1 (mVLC1) substituiert. Drei Monate alte männliche transgene Tiere wurden auf morphologische Veränderungen und physiologische Parameter des Herzens mittels Echokardiographie, Zell-Verkürzungsmessungen (isolierte adulte Kardiomyozyten) und isoliert perfundierte Herzen nach Langendorff untersucht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien waren von analytischer Reinheit und wurden, soweit nicht anders aufgeführt, von den Firmen Biozym (Oldendorf), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

#### 2.1.2 Oligonukleotide

Tabelle 1 zeigt die Sequenz der für die PCR verwendeten Oligonukleotidprimer. Alle eingesetzten Primer wurden von der Firma BioTez (Berlin) synthetisiert.

**Tab. 1: In der PCR eingesetzte Oligonukleotidprimer.** fw – Vorwärtsprimer, rev – Rückwärtsprimer, eingefügte Punktmutationen sind **fett/rot**, Schnittstellen klein/*kursiv*, Kozak-Sequenz unterstrichen, myc-Tag **blau** und HIS-Tag **grün** dargestellt; FAM – 6-carboxyfluorescein (Fluorophor) und TAMRA – Tetramethylrhodamin (Quencher) der TaqMan-Sonde.

	Bezeichnung	5'- Primersequenz - 3'
1.	hVLC1 fw	GGaagcttGATGGCCCCCAAAAAGCCAG
2.	hVLC1 rev	GGaagcttGTTAGCTGGACATGATGTGC
3.	hVLC1 <sup>E56G</sup> fw	GATTGAAGAGTTCAAGG <b>G</b> AGCCTTCATG CTGTTCCG
4.	hVLC1 <sup>E56G</sup> rev	CGAACAGCATGAAGGCT <b>C</b> CCTTGAAGCTC TTCAATC
5.	hVLC1 <sup>A57G</sup> fw	GAAGAGTTCAAGGAAG <b>G</b> CTTCATGCTGT TCGACCG
6.	hVLC1 <sup>A57G</sup> rev	CGGTCGAACAGCATGAAG <b>C</b> CTTCCTTGA ACTCTTC
7.	hVLC1 <sup>E143K</sup> fw	CGGGTCTTCGACAAG <b>A</b> AGGGCAATGGC ATCGTC
8.	hVLC1 <sup>E143K</sup> rev	GACAGTGCCATTGCCCT <b>T</b> CTTGTCGAAG ACCCG
9.	hVLC1 <sup>M149V</sup> fw	GGCAATGGCACTGT <b>C</b> GTTGGGTGCTGAG CTTCGC
10.	hVLC1 <sup>M149V</sup> rev	GCGAAGCTCAGCACCCA <b>C</b> GACAGTGCC ATTGCC
11.	hVLC1 <sup>R154H</sup> fw	GGGTGCTGAGCTTC <b>A</b> CCACGTGCTGGC

		CACGC
12.	hVLC1 <sup>R154H</sup> rev	GCGTGGCCAGCACGTGGTGAAGCTCAG CACCC
13.	hVLC1 TGM fw	GGaagcttGCCACCATGGCCCCCAA
14.	Seq.Primer $\alpha$ -MyHC-Prom fw	ATGGAGTCCTGGTGGGAGA
15.	nPCR-TGM im Prom fw	ATCTTGGCTCTTCGTCTTC
16.	nPCR-TGM in hVLC1 rev	GCTCAGGTGTGAACTCAAT
17.	hVLC1_E56G_pc3HIS fw	CCaagcttGCCACCATGATCATCATCATC ATCATATGGCCCCCAAAAGCC
18.	hVLC1_E56G_pc3HIS rev	ACCaagcttTTAGCTGGACATGATGTGCTT CACAAA
19.	hVLC1wt_pc3MYC fw	CCaagcttGCCACCATGGAACAAAACTCA TCTCAGAAGAGGATCTGATGGCCCCCAA AAAGCC
20.	hVLC1wt_pc3MYC rev	ACCaagcttTTAGCTGGACATGATGTGCTT CACAAA
21.	hVLC1-Sonde-TaqMan	FAM-AGCTTCGCCACGTGCTGGCC- TAMRA
22.	hVLC1-fw-TaqMan	GGGCAATGGCACTGTCATG
23.	hVLC1-rev-TaqMan	TTCGTCTTCTGTCAGCCTCTCA
24.	18S-Sonde-TaqMan	FAM-CGCGCAAATTACCCACTCCCGAC- TAMRA
25.	18S-fw-TagMan	ACATCCAAGGAAGGCAGCAG
26.	18S-rev-TagMan	TTTTCGTCACTACCTCCCCG

### 2.1.3 Antikörper, Enzyme, Antibiotika

**Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete Antikörper.** Primäre (1-5) und sekundäre (6-9) Antikörper, Spezies und Bezugsfirmen.

	Antikörper	Spezies	Firma
1.	anti-hVLC1	Kaninchen, polyklonal	Geschenk von Fr. Dr. Haase
2.	anti-HIS-Tag	Maus, monoklonal	Quiagen, Hilden
3.	anti-GST-Tag	Maus, monoklonal	Invitrogen, Karlsruhe
4.	anti-c-myc-Tag	Huhn, monoklonal	Invitrogen, Karlsruhe



## 2. Material und Methoden

5.	anti-HIS-Tag	Maus, monoklonal	Invitrogen, Karlsruhe
6.	anti-Maus-HPR	Schaf	Sigma-Aldrich, Steinheim
7.	anti-Kaninchen-HRP	Esel	Pierce Biotechnology, Bonn
8.	Alexa-Fluor-568-anti-Maus	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
9.	Alexa-Fluor-488-anti-Huhn	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe

### Enzyme

<i>HindIII</i>	BioLabs, New England, USA
<i>EcoRI</i>	BioLabs, New England, USA
Complete Mini-Proteaseinhibitoren	Roche, Mannheim
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Dream <i>Taq</i> Green DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
DirectPCR Lysis Reagent	PeqLab, Erlangen
Proteinase K	Roche, Mannheim

### Antibiotika

Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Gentamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim

### **2.1.4 Puffer und Stammlösungen**

Alle Lösungen wurden nach standardisierten Protokollen mit bidestiliertem Wasser angesetzt und bei Bedarf autoklaviert bzw. sterilfiltriert.

Bicarbonatpuffer	0,159 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
auf 100 ml, pH 9,6	0,293 g NaHCO <sub>3</sub>
	0,02 g NaN <sub>3</sub>
Blocklösung	1fach TBS-Tween
auf 50 ml	5 % Magermilch

## 2. Material und Methoden

---

Blotpuffer auf 2 l H <sub>2</sub> O	28,8 g Glycin 6,0 g Tris 400 ml Methanol
CD-Puffer in H <sub>2</sub> O, pH 7,4	10 mM Tris 120 mM NaF
Coomassie-Blau auf 1 l H <sub>2</sub> O	10 % Essigsäure 30 % Methanol 100 mg Coomassie Brilliant Blue G250
10fach Elektrophorese- puffer auf 1 l H <sub>2</sub> O	30,3 g Tris Base 144,0 g Glycin 10 g SDS
GST-Elutionspuffer auf 25 ml	25 ml Bicarbonatpuffer 0,15 g L-Glutathion 0,025 g Chaps 1 Tablette Mini-Proteaseinhibitoren
HIS-Elutionspuffer auf 20 ml, pH 8,0	1fach PBS 100 mM Imidazol 1 Tablette Mini-Proteaseinhibitoren
Krebs-Henseleit-Puffer modifiziert für LD (KHP) in H <sub>2</sub> O	2,1 mM MgSO <sub>4</sub> 118 mM NaCl 4,7 mM KCl 0,06 mM EDTA 24,7 mM NaHCO <sub>3</sub> 1,2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,0 mM CaCl <sub>2</sub> 11,0 mM Glukose

## 2. Material und Methoden

---

LB-Agar (nach Miller)	AppliChem GmbH, Darmstadt
LB-Medium (nach Miller)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Lysispuffer auf 10 ml	1fach PBS 10 % N-Lauryl-Sarkosyl-Natriumsalz 1 Tablette Mini-Proteaseinhibitoren
Medium für isolierte adulte Kardiomyozyten M199* auf 1 l H <sub>2</sub> O	9,4 g M199 0,2 % BSA 5 % FKS 5,0 mM Kreatin 5,0 mM Taurin 2,0 mM L-Carnitin 0,01 mM Cytosin-D-arabinofuranoside 26,2 mM NaHCO <sub>3</sub> 2,0 ml Gentamycin (10 mg/ml)
MyF-Puffer 1 in H <sub>2</sub> O, pH 7,0	300 mM Saccharose 10 mM Imidazol
MyF-Puffer 2 in H <sub>2</sub> O, pH 7,0	60 mM KCl 30 mM Imidazol 2 mM MgCl <sub>2</sub>
MyF-Puffer 3 in H <sub>2</sub> O, pH 7,0	60 mM KCl 30 mM Imidazol 2 mM MgCl <sub>2</sub> 2 mM EGTA
MyF-Puffer 4 in H <sub>2</sub> O, pH 7,0	60 mM KCl 30 mM Imidazol 2 mM MgCl <sub>2</sub> 1 % Triton-X-100

## 2. Material und Methoden

---

Niedrigsalz(NS)-PBS	2/3 1fach PBS 1/3 H <sub>2</sub> O
10fach PBS auf 1 l H <sub>2</sub> O, pH 7,4	80 g NaCl 2 g KCl 11,5 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O 2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Regenerationspuffer in H <sub>2</sub> O	130 mM NaCl 0,5 % Chaps 0,5 % Tween-80 0,5 % Tween-20 0,5 % Triton X-100
Relaxing-Lösung in H <sub>2</sub> O, pH 7,1	7 mM ATP 5 mM EGTA 8 mM Magnesiumacetat 6 mM Imidazol 70 mM Kaliumpropionat
Sammelgelpuffer auf 250 ml H <sub>2</sub> O, pH 6,8	15,14 g Tris Base
4fach Probenpuffer für SDS-Gele ergibt 5 ml	1,25 ml Sammelgelpuffer 2,5 ml Glycerol 1 ml 20 % SDS 0,1 ml 0,2 M-EGTA 0,1 ml 0,2 M-EDTA 0,05 ml Bromphenolblau
50fach TAE auf 0,5 l H <sub>2</sub> O, pH 8,0	121 g Tris 28,55 ml Essigsäure 50 ml 0,5 M-EDTA

10fach TBS auf 2 l H <sub>2</sub> O, pH 8,0	176 g NaCl 200 ml 1 M Tris
TBS für AK auf 250 ml H <sub>2</sub> O, pH 8,0	1,5 g Tris 1,8 g NaCl 2,5 g BSA frac. V 0,1 g NaN <sub>3</sub>
TBS-Tween	1fach TBS 20 % Tween
Trenngelpuffer auf 250 ml H <sub>2</sub> O, pH 8,8	45,41 g Tris Base

### 2.1.5 Molekulargewichtsmarker

Supercoiled DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
100 kb Ladder	BioLabs, New England, USA
Perfect Plus 1 kb Ladder	Roboklon, Berlin
GeneRuler 1 kb Plus Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
DNA Molecular Weight Marker XVII	Roche, Mannheim
Precision Plus Protein Standards Dual Color	Bio-Rad, München

### 2.1.6 Versuchstiere und Zellen

Für Langendorff-Versuche mit isolierten murinen Herzen sowie Zell-Verkürzungsexperimente mit isolierten adulten murinen Kardiomyozyten wurden Herzen der generierten transgenen Mauslinien TGM/hVLC1 und TGM/hVLC1<sup>E56G</sup> verwendet. Die Haltung erfolgte bei einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus mit freiem Trinkwasserzugang und Fütterung einer kommerziellen Trockendiät für Nager (SSNIFF R-Z, Spezialdiäten GmbH, Soest) im Tierhaus des Max-Delbrück-Centrums für molekulare Medizin (MDC). Das Absetzen der Jungtiere und die Markierung über Ohrnummern erfolgten mit einem Alter von 4 Wochen. Zwei bis sechs Tiere wurden pro Käfig, getrennt nach Geschlecht, gehalten. Beim Eintritt in den Versuch lag das Alter der Tiere bei 12-14 Wochen.

Die Versuche wurden durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales in Berlin genehmigt; Tierversuchsgenehmigung: G0178/07

Isolierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten für Transfektionsversuche wurden von der Firma E.R.D.E (Berlin) bezogen.

### 2.1.7 Narkotika und Blutverdünner

Ketamin (10 % Ketaminhydrochlorid)	Sanofi-Aventis, Frankfurt
Xylazin 2 %	Sanofi-Aventis, Frankfurt
Heparin-Natrium-25000	Ratiopharm, Ulm

### 2.1.8 Bakterienstämme

Top10F'	Invitrogen, Karlsruhe
BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	Stratagene, Amsterdam, Niederlande

### 2.1.9 Plasmidvektoren

#### Prokaryotische Vektoren

Zwischenklonierungsvektor:

pCR 2.1	Invitrogen, Karlsruhe
---------	-----------------------

Expressionsvektoren:

pET28a HIS-Tag	Novagen, Merck-Gruppe, Darmstadt
pRSETA HIS-Tag	Invitrogen, Karlsruhe
pGEX-4T1 GST-Tag	Amersham (GE Healthcare), München

#### Eukaryotischer Vektor

pcDNA3.1(+)	Invitrogen, Karlsruhe
-------------	-----------------------

### 2.1.10 Weitere Materialien und Kits

Amersham-Hybond-ECL	GE-Healthcare, Uppsala, Schweden
Amersham-Hyperfilm-ECL	GE-Healthcare, Uppsala, Schweden
Amicon Ultra 30K	Millipore, Billerica, USA
BallonKit für Maus	HSE, March-Hugstetten
Faden Ethibond	Johnson & Johnson, Norderstedt
GelGreen Nucleic Acid Stain	Biotium, Köln
Glutathion-Sepharose-4B	GE-Healthcare, Uppsala, Schweden
High-Capacity DNA Reverse-Transcription Kit	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Invisorb Spin Plasmid Mini Two	Invitex, Berlin
Invisorb Plasmid Maxi Kit	Invitex, Berlin
Invisorb Spin DNA Extractions Kit	Invitex, Berlin
Lab-Tek Chambered Coverglass	Nunc, Langenselbold
Lipofectamin™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe
MicroAmp Fast Optical 96-Well Plate	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Mowiol	Roth, Karlsruhe
M199	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
Nonidet NP40	Roche, Mannheim
PD MidiTrap G25	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Ponceau-S-Lösung	AppliChem, Darmstadt
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SM20-I	Biochrom, Berlin
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
T4-DNA-Ligase Kit	Invitrogen, Karlsruhe
QuikChange II Site-Directed-Mutagenesis Kit	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Menzel-Deckgläser	Menzel-Glaser, Braunschweig
Immobilon™ Western	Millipore, Billerica, USA
Zellkultur Testplatten 12	TPP, Trasadingen, Schweiz

### 2.1.11 Geräte

Apollo 65000	MaxiCraft Kleinbohrmaschinen, Berlin
AB 7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Axiovert 40 CFL	Zeiss, Göttingen
Biacore 2000	Biacore, Uppsala, Schweden
Bio-Rad GelDoc 2000	Bio-Rad Laboratories, München
Beckmann-Rotor JLA-10.500	Beckmann Coulter, Krefeld
CO <sub>2</sub> -Inkubator Serie CB	Binder GmbH, Tuttlingen
DNA Thermal Cycler	PerkinElmer, Waltham, USA
Eppendorff Centrifuge 5417R	Eppendorff, Hamburg
Fluoreszenz Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss, Göttingen
Harvard Pump No. 22	Instech Solomon, Plymouth, USA
IonOptix Fluoreszenz- u. Kontraktilitätssystem	IonOptix, Milton, USA
J2-HS Centrifuge	Beckmann Coulter, Krefeld
J-720 Spektrometer	Jasco, Tokyo, Japan
Langendorff-Perfusionsapparatur	HSE, March-Hugstetten
Leica TCS SP5 konfokal Mikroskop	Becker&Hickl, Berlin
Megafuge 1.0 R	Thermo-Scientific, Dreieich
Mikroskop CK2	Olympus, Hamburg
Mini-SUB <sup>®</sup> CELL GT	Bio-Rad Laboratories, München
Multitron	Infors HT, Bottmingen, Schweiz
Nassblotapparatur	Bio-Rad Laboratories, München
Optima <sup>™</sup> L-100K Ultracentrifuge	Beckmann Coulter, Krefeld
Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Power Supply Model200/2.0	Bio-Rad Laboratories, München
Quarzküvetten	Hellma, München
Sicherheitswerkbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Sonopuls HD70	Bandelin, Berlin
Spectrophotometer ND(NanoDrop)-1000	PEQLAB, Erlangen
Stimulator C Type 224	HSE, March-Hugstetten
SUB-CELL <sup>®</sup> GT	Bio-Rad Laboratories, München
T-Gradient	Biometra, Göttingen
Zentrifuge Heraeus Multifuge	Thermo Scientific, Ulm



### 2.2 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden

#### 2.2.1 Primerdesign, Polymerase-Kettenreaktion und Sequenzierung

Die Länge der designten Primer betrug zwischen 19 - 36 Basenpaaren. Dies gewährleistete eine ausreichende Spezifität und ermöglichte gleichzeitig eine gute Hybridisierung an die Ziel-DNA. Der Anteil der Basen Guanin (G) und Cytosin (C) betrug dabei 50 % - 60 %. Primer-Paare wurden so gestaltet, dass ihre Schmelztemperaturen möglichst nahe beieinander lagen. Am 3'-Ende der Primer wurden jeweils in ein bis zwei Kopien die Basen G oder C angefügt, um eine stabilere Bindung aufgrund der drei Wasserstoffbrücken zwischen Guanin und Cytosin zu ermöglichen. Die Primer wurden zusätzlich auf Haarnadelstrukturen und komplementäre Sequenzen überprüft, um das Binden untereinander oder mit sich selbst auszuschließen. Zu hohe Annealing Temperaturen ( $T_{an}$ ) führen zu unzureichender DNA-Primer-Hybridisierung und wenig PCR-Produkt, während unspezifische Produkte aufgrund von Basenpaar Fehlpaarungen bei zu niedrigen Annealing Temperaturen auftreten können. Bei den verwendeten Temperaturen zwischen 55-65 °C wurde spezifisch die Ziel-DNA vervielfältigt.

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) diente der Amplifizierung eines Zielbereiches innerhalb der genomischen oder cDNA, welcher durch einen Vorwärts- und Rückwärtsprimer genau festgelegt wurde. Das PCR-Produkt konnte später im Restriktionsverdau, zur Klonierung in verschiedene Plasmidvektoren oder als Nachweis für das hVLC1- bzw. hVLC1<sup>E56G</sup>-Konstrukt in transgenen Mäusen (TGM) genutzt werden. Bei der PCR wurden drei sich wiederholende Phasen unterschieden, welche die Denaturierung der Ausgangs-DNA (*template*-DNA) zu Einzelsträngen, das Binden der Primer an die Ziel-DNA (Annealing) und die Elongation der Primer umfassten. Diese drei Schritte wurden zyklisch zwischen 25- bis 32-mal wiederholt, um eine exponentielle Vervielfältigung der Ziel-DNA zu erreichen. Die Länge und Häufigkeit der einzelnen Abschnitte wurde in Abhängigkeit von der Größe des erwarteten Produktes und der Spezifität der Primer gewählt und gegebenenfalls optimiert.

Die Amplifizierung der *template*-DNA von hVLC1 oder rß-MyHC<sub>664-915</sub> erfolgte im Biometra T-Gradient Thermoblock in einem Gesamtvolumen von jeweils 25 µl. Die einzelnen PCR Komponenten wurden wie folgt eingesetzt:

**Tab. 3: Endkonzentration der in der PCR eingesetzten Substanzen pro Probe und Cyclerprogramm.**

Substanz	Endkonzentration	Cyclerprogramm	
PCR Puffer	1fach	5 min	94 °C
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	30 sek	94 °C
dNTP-Mix	0,2 mM	30 sek	57 °C
Primer fw	0,2 µM	90 sek	72 °C
Primer rev	0,2 µM	30 Zyklen	
template-DNA	100 ng	10 min	72 °C
<i>Taq</i> -Polymerase	2 U	∞	4 °C
H <sub>2</sub> O	auf 25 µl		

Als Ausgangs-cDNA für die Zwischenklonierung von hVLC1 in den pCR2.1 Vektor wurde aufgereinigte Plasmid-DNA des „full length cDNA clones“-IRAU<sub>p969E0154D</sub> (MYL3, Myosin, light chain 3, alkali, ventricular, NP\_000249.1) von imaGenes (Berlin) genutzt. Die rß-MyHC<sub>664-915</sub> cDNA wurde freundlicherweise von Frau Dr. Petzholt zur Verfügung gestellt (Anhang 6.3). Die Sequenzierung zur Kontrolle der amplifizierten DNA wurde anschließend durch die Firma Invitek (Berlin) durchgeführt.

Der Nachweis des Transgen-Konstrukts im Rahmen der Genotypisierung der TGM-Linien erfolgte nach dem Protokoll der Dream Taq Green DNA Polymerase mit 32 Zyklen bei 94 °C (60 sek), 62,5 °C (60 sek) und 72 °C (90 sek) ebenfalls im Biometra T-Gradient Thermoblock.

### 2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese, DNA-Messung, Restriktionsverdau

Die Agarose-Gelelektrophorese diente zur Auftrennung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten und erfolgte in horizontalen 0,8 %igen Gelen. Dabei wanderten negativ geladene DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld zur positiven Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit war neben der angelegten Spannung und der Wahl der Gelmatrix von der Größe und Länge der jeweiligen DNA abhängig, d.h. kleine Moleküle gelangten leichter durch die Gelporen als große Fragmente. Zur Größenbestimmung unbekannter Produkte wurde ein Längenstandard bekannter Größe (Marker) mitgeführt.

Agarose wurde in 1fach TAE Puffer unter Erhitzen gelöst, nach dem Abkühlen auf 60 °C mit GelGreen Nucleic Acid Stain versetzt (1,5 µl je 50 ml) und anschließend zur Polymerisierung in Agarose-Gelkammern gegossen. Der Lauf wurde in 1fach TAE Puffer bei Raumtemperatur (RT) und 100 V mit dem Power Pack P25 durchgeführt und der Supercoiled DNA Marker bei ringförmiger Plasmid-DNA als Größenstandard mitgeführt. Für PCR-Produkte und hydrolysierte DNA wurde die Größe der Fragmente über den 100 kb Marker oder den Perfect Plus 1 kb Marker bestimmt (Anhang 6.2). Die Kontrolle, Dokumentation und gegebenenfalls Isolation der Banden mit einem Skalpell erfolgte auf dem UV-Schirm des Bio-Rad GelDoc 2000. Für die weitere Aufreinigung der Banden aus dem Gel wurde das Invisorb Spin DNA Extraction Kit verwendet.

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA oder RNA mittels photometrischer Messung wurde die Absorption bei 260 nm mit dem Spectrophotometer ND-1000 bestimmt und nach folgender Formel berechnet:

$$C[\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} * V * F$$

Dabei stellt C die Konzentration, V den Verdünnungsfaktor und F den Multiplikationsfaktor dar. Zusätzlich wurde der Absorptionskoeffizient 260 nm/280 nm, der dem Verhältnis von Nukleinsäuren zu Proteinen in Lösung entspricht, als Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren berechnet. Der Wert für saubere Nukleinsäuren sollte dabei zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Für die Restriktionsanalyse wurde circa 1 µg DNA mit 1 - 6 U des entsprechenden Restriktionsenzym und dem vom Hersteller angegebenen 10fach Puffer in einem Gesamtvolumen von 25 µl für 1 h bei 37 °C hydrolysiert. Anschließend wurde der Verdau über eine 0,8%ige Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, dokumentiert und bei Bedarf die entsprechenden Banden isoliert und aufgereinigt. Für die Verwendung zur Klonierung oder Ligation wurden größere Mengen DNA im Restriktionsverdau eingesetzt, um Verluste durch die Gel-Aufreinigung auszugleichen.

### 2.2.3 Klonierung, Ligation und Transformation in *E.coli*

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Vektoren für die Proteinexpression handelt es sich um prokaryotische Zwischenklonierungs- (pCR2.1) und Expressionsvektoren, welche mit verschiedenen N-terminalen Markierungen (Tags) versehen waren (pRSETA/pET28a mit HIS-Tag, pGEX-4T1 mit GST-Tag). Die Tags dienten zur Aufreinigung der Proteine mittels Affinitätschromatographie und zum Nachweis im Westernblot über entsprechende anti-HIS- oder anti-GST-Antikörper.

Das Konstrukt für das rekombinante hVLC1 Protein wurde so entworfen, dass alle kodierenden Exons (cDNA) mit Start- und Stop-Codon enthalten waren (Anhang 6.3). Die rß-MyHC<sub>664-915</sub> cDNA umfasste die Hals-Region (Hebelarm) der schweren Myosinkette von den Aminosäuren 664 - 915 (Anhang 6.3), welche die IQ1 und IQ2 Konsensus-Sequenzen zur Bindung der ELC und RLC enthielt. Start- und Stop-Codon wurden in diesem Fall über die Primer eingefügt. Der N-terminale HIS- bzw. GST-Tag wurde durch den entsprechenden Zielvektor und die Schnittstellen für *HindIII* durch die Primer zur Verfügung gestellt.

Die Subklonierung der PCR-Produkte erfolgte in den pCR2.1 Vektor. Dabei handelte es sich um einen bereits mit *EcoRI* linearisierten Vektor, welcher 3'-T-Überhänge an beiden Enden besitzt. Diese unterbinden eine Selbstligation des Vektors und sind kompatibel mit den, von der *Taq*-Polymerase erzeugten, 5'-A-Überhängen des PCR-Fragments. Somit konnte das PCR-Produkt direkt in den Vektor eingebracht werden. Für die Klonierung in den jeweiligen Zielvektor (Expressionsvektor) wurden die über Primer eingebrachten Schnittstellen für *HindIII* genutzt. Der Zielvektor wurde mit *HindIII* linearisiert und das hVLC1 Insert über Verdau mit *HindIII* aus dem pCR2.1 Vektor gewonnen. Bei Beiden erfolgte eine Aufreinigung über die Agarose-

Gelelektrophorese und nachfolgend eine DNA-Konzentrationsbestimmung. Anschließend wurde hVLC1 cDNA in den pRSETA- oder pET28a-Vektor bzw. rß-MyHC<sub>664-915</sub> cDNA in den pGEX-4T1 Expressionsvektor ligiert.

Das Volumen eines Ligationsansatzes betrug 10 µl und enthielt, neben den DNA-Fragmenten und dem linearisierten Vektor, T4-DNA-Ligase und T4-DNA-Ligasepuffer. Die gereinigten PCR- oder DNA-Fragmente wurden im 3- bis 10fachen Überschuss im Verhältnis zum Vektor zugegeben. Die Ligation wurde nach dem Protokoll des Herstellers Invitrogen für *cohesive ends* durchgeführt und direkt für die Transformation in *E.coli* verwendet.

Für die Transformation wurden sowohl Ligationsansätze als auch präparierte Plasmid-DNA genutzt. Die kompetenten Zellen (*E.coli*) wurden nach Protokoll des Herstellers eingesetzt, Aliquots des Transformationsansatz auf LB-Platten mit dem vorgegebenen Antibiotikum (Anhang 6.1) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Auf den Platten gewachsene Klone wurden in 3 ml LB-Medium mit Antibiotikum über Nacht inkubiert und die Isolierung der Plasmid-DNA mit dem Invisorb Spin Plasmid Mini Two oder dem Invisorb Plasmid Maxi Kit nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Alle Klone wurden mittels Sequenzierung auf ihre Sequenz überprüft und korrekte Klone als Glycerolstock (1:2) bei -80 °C gelagert.

### 2.2.4 Mutagenese

Als Vorlage für die Mutagenese diente die im pRSETA oder pGEX-4T1 Vektor vorliegende hVLC1 bzw. rß-MyHC<sub>664-915</sub> cDNA. Über die entworfenen Mutagenese-Primer wurden nach dem Protokoll des QuikChange II Site-Directed-Mutagenesis Kit verschiedene Punktmutationen in die cDNA eingefügt. Bei der humanen essentiellen ventrikulären leichten Myosinkette handelte es sich dabei um die mit hypertropher Kardiomyopathie assoziierten Mutationen E56G, A57G, E143K, M149V und R154H. Bei der rß-MyHC<sub>664-915</sub> cDNA wurde über einen Ala-Scan, d.h. der Punktmutation aufeinander folgender Aminosäuren zu Alanin, das zweite IQ-Motiv und damit die Bindungsstelle für die RLC entfernt. Dabei wurden vier Schlüsselaminosäuren I814, Q815, R819, W827, welche maßgebend an der Bildung der RLC involviert sind, zu Alanin verändert. Das neue Fusionsprotein wurde als rß-MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup> bezeichnet.

### 2.2.5 Expression rekombinanter Proteine

Rekombinante hVLC1 Proteine waren N-terminal HIS-markiert (getaggt). Dabei besaß der pRSETA-Vektor zwischen dem 6xHIS-Tag und dem ATG-Startcodon der cDNA einen Spacer (Abstandshalter) von 38 Aminosäuren. Der pET28a-Vektor enthielt dagegen keinen Spacer. Auf den 6xHIS-Tag folgte sofort das Insert. Der Vektor pGEX-4T1 wurde zur Expression der rekombinanten Proteine r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub> und r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup> mit N-terminalem GST-Tag genutzt.

Die Transformation für die Expression erfolgte in BL21-CodonPlus(DE3)-RIL *E.coli* Zellen. Für die Übernacht-Kultur wurden 100 ml LB-Medium mit dem entsprechenden, vom Vektor abhängigen, Antibiotikum (Ampicillin 100 µg/ml, Chloramphenicol 50 µg/ml, Kanamycin 20 µg/ml) sowie Glukose (0,5 mg/ml) versehen, mit der gewünschten Zellkultur angeimpft und bei 37 °C schüttelnd (280 rpm) über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Volumen des Expressionsansatzes mit vorgewärmtem LB-Medium auf einen Liter erhöht und bei 37 °C schüttelnd bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 - 0,6 inkubiert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von 1 ml einer 1 molaren IPTG-Lösung. Anschließend wurden die Kulturen bei 37 °C (hVLC1 und Mutanten) bzw. 31 °C (r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub> und r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup>) für weitere 3-4 Stunden inkubiert und nachfolgend die Zellen über Zentrifugation im Beckmann-Rotor JLA-10.500 für 10 min bei 8100 rpm/°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die Bakterienpellets in 10 ml Lysispuffer resuspendiert. Die Lyse der Bakterienzellen wurde zusätzlich über einen Gefrier-Tau-Zyklus und Sonofikation für 2x45 Sekunden unterstützt. Die Zelltrümmer wurden mit der Optima™L-100K Ultracentrifuge bei 20.000 rpm für 30 min bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand mit den rekombinanten GST- oder HIS-getaggten Proteinen auf Glutathion-Sepharose-4B- bzw. Ni-NTA-Agarose-Säulen überführt und bei 4 °C 1,5 h drehend inkubiert. Anschließend wurden die an die Säulen gebundenen Proteine mehrmals mit kaltem 1fach PBS gewaschen bis die OD<sub>280</sub> des Waschpuffers bei Null im Vergleich zu 1fach PBS als Blank lag.

Die Elution der rekombinanten HIS-Tag-Proteine erfolgte, nach einer Vorelution mit 1fach PBS/20 mM Imidazol, mit HIS-Elutionspuffer. Für die Elution der rekombinanten GST-Tag-Proteine wurde, nach einer Vorequilibration der Säule mit

2 ml Bicarbonatpuffer, GST-Elutionspuffer verwendet. Die Elutionsvolumina betrugen jeweils 2 ml und wurden für 5 - 7x mit steigender Inkubationszeit (1 min, 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, ÜN) bei 4 °C durchgeführt. Zur Kontrolle der Expression wurden die Fusionsproteine auf einem 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau dargestellt. Nach dem Umpuffern mit PD MidiTrap G25 Säulen und Aufkonzentrieren über Amicon Ultra 30K Säulen erfolgte die Lagerung bei -20 °C.

### 2.2.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblot

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) nach Laemmli (1970). Dabei wurden die Proben in Probenpuffer und DTT (2 mM) aufgenommen, bei 95 °C für 5 min inkubiert und anschließend über ein 12%iges SDS-Gel (Tab. 4) aufgetrennt. Zusätzlich zu den Proben wurde der Precision Plus Protein Standard als Marker mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte für 15 min bei 100 V mit anschließender Erhöhung der Voltzahl auf 140 V für weitere 45 min.

Tab. 4: Zusammensetzung eines 12%igen Trenngels mit 5%igem Sammelgel für die SDS-Page.

	Sammelgel (5%)	Trenngel (12%)
H <sub>2</sub> O	5,7 ml	6,8 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml	-
Trenngelpuffer	-	5 ml
Acrylamid	1,7 ml	8 ml
SDS (10 %)	100 µl	200 µl
Temed (1:10)	70 µl	140 µl
APS (10 %)	140 µl	280 µl

Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung der Proben wurden die SDS-Gele entweder mit Coomassie-Blau gefärbt oder auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Der Transfer der Proben auf die Nitrocellulose-Membran erfolgte in einer Nassblotapparatur mit 1fach Blotpuffer für 90 min bei 250 mA mit anschließendem Nachweis über Ponceau-S-Lösung. Die Immunodetektion der Proteine fand mit spezifischen anti-HIS-Tag-, anti-GST-Tag- und anti-hVLC1 (gegen N-terminale-

Peptidsequenz Mca-Gly\_PKKPEPKKDDAKA, entspricht AS 3-15 in hVLC1) Antikörper statt. Dazu wurde die Membran 3x mit TBS-Tween (2.1.4) gewaschen, 1 h bei RT mit Blocklösung (2.1.4) inkubiert, 1x mit TBS (2.1.4) gewaschen und mit dem entsprechenden primären Antikörper für 1 h bei RT oder bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde erneut mit TBS-Tween gewaschen und der Sekundär-Antikörper nach entsprechender Verdünnung (Angaben des Herstellers) eingesetzt. Die Sekundär-Antikörper waren mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert und konnten mittels einer Chemilumineszenz-Reaktion über den Immobilon™ Western auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden.

### 2.3 Ultrazentrifugation

Die Konzentrationsverteilung gelöster Makromoleküle kann mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation unter dem Einfluss von starken Zentrifugalkräften untersucht werden. Im Schwerfeld wurden die verschiedenen Bestandteile der Probe nach Form, Teilchengröße und -dichte fraktioniert und der Sedimentationsprozess optisch detektiert. Die Absorption der Makromoleküle steht dabei im proportionalen Verhältnis zur Molekülkonzentration (Behlke et al., 1997; Behlke et al., 2003). Untersuchungen zur molekularen Masse erfolgten mit der Optima™L-100K Ultrazentrifuge. Dabei wurden Proben in steigender Konzentration in einem Volumen von 70 µl zuerst für 2 h bei 20000 rpm (Overspeed) und anschließend für ~30 h bei 16000 rpm (Equilibriumspeed) bei 10 °C in 6-Kanal-Zellen zentrifugiert. Die Molekulargewichtsverteilung wurde bei drei verschiedenen Wellenlängen zwischen 240 und 295 nm gemessen. Die Molmassen der einzelnen Komponenten wurden aus den Konzentrationsprofilen mit der Software POLYMOL abgeleitet.

### 2.4 CD-Spektrum und Schmelzkurve

Circular Dichroismus (CD)-Spektren wurden für die Charakterisierung der sekundären Strukturen der Proteine in Lösung genutzt. Zusätzlich wurde die Rückfaltung von denaturierten Proteinen nach der Schmelzkurve untersucht (Brahms et al., 1980). CD-Spektren nutzen die Chiralität von Molekülen, d.h. ihre optisch aktiven Verbindungen. CD-Signale treten vor allem in zwei Spektralbereichen auf. Zum einen im kurzwelligen UV-Bereich von 170-250 nm (Amid-Region) für Peptidbindungen, zum anderen im langwelligen UV-Bereich 250-300 nm von



aromatischen Aminosäuren. Disulfidbrücken erzeugen Signale bei 250 nm.  $\alpha$ -helikale Proteinstrukturen zeigen eine charakteristische optische Aktivität aufgrund der asymmetrischen  $\alpha$ -Kohlenstoffatome sowie durch Kopplung mit benachbarten Bindungen.

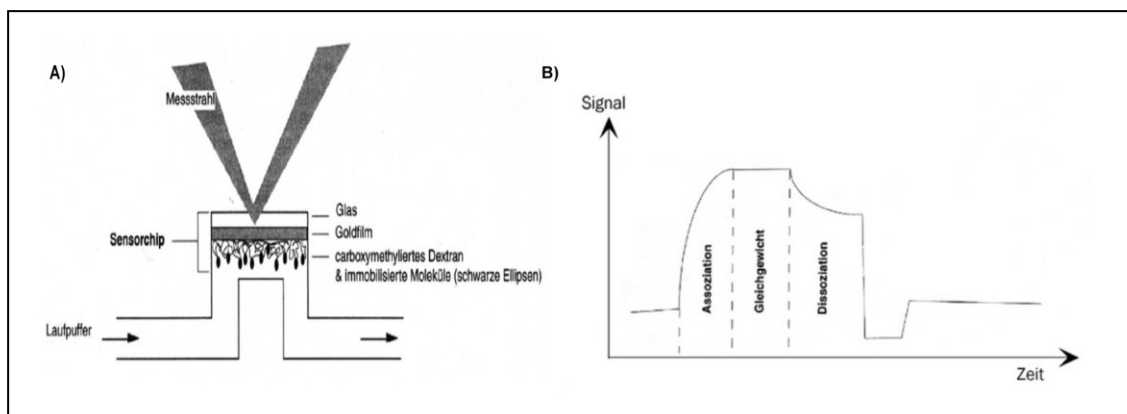
Die Aufzeichnung der CD-Spektren von verschiedenen Fusionsproteinen erfolgte mit dem J-720 Spektrometer in 1 mm Quarzküvetten bei 25 °C. Die Messgeschwindigkeit lag bei 50 nm/min bei einer Bandbreite von 1 nm und einer Reaktionszeit von 2 s. Die hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> Proteine wurden in verschiedenen Konzentrationen in CD-Puffer überführt und für CD-Spektrum- oder Schmelzkurvenmessungen eingesetzt. Der CD-Puffer war kaum absorbierend und wurde später als Blank von den Messungen abgezogen. CD-Spektren wurden im Bereich von 180 bis 250 nm aufgenommen. Zur Auswertung wurden die Spektren anschließend im festgelegten Bereich gefittet und die Sekundärstruktur der analysierten Fusionsproteine über die Zusammensetzung bereits bekannter Proteine berechnet und verglichen (Brahms et al., 1980, Kelly et al., 2005).

Die Schmelzkurve wurde über die kontinuierliche Detektion der CD-Werte bei 218 nm während der Denaturierung der Proteine mithilfe der Temperaturerhöhung von 4 °C auf 94 °C erstellt. Die Aufnahmen erfolgten alle 4 Sekunden bei einem Temperaturanstieg von 60 °C pro Stunde.

### 2.5 Oberflächen-Plasmon-Resonanz Analyse

Um die Interaktion zwischen zwei Bindungspartnern zu untersuchen, wurde die Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) mit Hilfe des Biacore Systems detektiert. Die SPR bot die Möglichkeit, mittels Assoziation und Dissoziation zweier Bindungspartner, die Bindungsaffinität, d.h. die Stärke einer Bindung, zu bestimmen. Auf der Oberfläche eines Sensorchips (CM5, Biacore) wurde einer der Interaktionspartner kovalent über seine NH<sub>2</sub>-Gruppe gebunden. Bei dem immobilisierten Bindungspartner (Ligand) handelte es sich um den kleineren Interaktionspartner (hVLC1 normal und mutierte Formen). Der andere Bindungspartner (Analyt) wurde in einem Laufpuffer gelöst und mit einer konstanten Flussrate in einem Mikroflusssystem über die Oberfläche des Chips geleitet (Abb. 10A). Auf der Oberfläche des Sensorchips kam es durch Bindung (Assoziation)

und Lösen (Dissoziation) des Analyten zum Liganden zu einer Veränderung der Massenkonzentration, welche, in Abhängigkeit von der Zeit, als Sensorgramm dargestellt wurde (Abb. 10B). Da der Analyt das größere Protein darstellte, wurde durch Assoziation und Dissoziation zum Interaktionspartner eine stärkere Veränderung in der Massenkonzentration erreicht. Diese Veränderung wurde mit Hilfe der SPR durch den Brechungsindex einer dünnen Schicht (Dextranschicht) detektiert und ein Ansteigen der Proteinmenge in der Messschicht, ausgelöst durch die Assoziation des Analyten, aufgezeichnet.



**Abb. 10: Darstellung des Sensorchips im Biacore-System und eines schematischen Sensorgramms der SPR.** A) Sensorchip in der Biacore Apparatur. Gemessen wird die Massenzunahme an der Dextranschicht. Um Sedimentationsartefakte zu vermeiden liegt der Chip oben, Sediment fällt nach unten. B) Sensorgramm. Bestimmung der Basislinie mit Laufpuffer, Injektion des Analyten im Laufpuffer und folgende Assoziation; Dissoziation mit reinem Laufpuffer, Regeneration zur Entfernung noch gebundener Analyten (Rehm, 2002).

Für die Bindungsstudien dieser Arbeit wurde eine Biacore 2000 Apparatur verwendet. Der Sensorchip wurde mit 90  $\mu\text{l}$  einer 1:2 Mischung aus 100 mM NHS (N-Hydroxysuccinimid) und 400 mM EDC (1-ethyl-3-(3 dimethylaminopropyl)carbodiimide) bei einer Flussrate von 10  $\mu\text{l}/\text{min}$  aktiviert. Die N-terminal HIS-getaggten rekombinanten hVLC1 Proteine (normale und mutierte Formen, ca. 0,1 mg/ml) wurden in einer 10 nM Na-Acetat-Lösung (pH 5,5) in einen sauren pH-Bereich gebracht und an der Dextranoberfläche des Sensorchips auf verschiedenen Spuren immobilisiert (2000 RU entspricht 3,2 ng/mm<sup>2</sup>). Zusätzlich wurde auf einer Bahn der pRSETA HIS-Tag mit Spacer als Blank gebunden. Anschließend wurde der Chip mit 70  $\mu\text{l}$  Ethanolamin-HCL (1 M, pH 8,5) geblockt, um unspezifische Bindungen zwischen Dextranoberfläche und Analyt zu vermeiden. N-terminal GST-getaggtes r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup> Fusionsprotein wurde als Analyt in NS-PBS in einer Konzentration von 0,25 - 6,5  $\mu\text{M}$  bei 25 °C und einer Flussrate von 10  $\mu\text{l}/\text{min}$  für

12 min (Assoziationszeit) über den Chip injiziert. Danach erfolgte eine ebenso lange Dissoziationszeit mit reinem NS-PBS Laufpuffer. Für die Regeneration des Chips zur Basislinie wurde Regenerationspuffer in alle Kanäle injiziert. Der Blank wurde später, vor der Auswertung mit der BIAevaluation Software, von allen Läufen subtrahiert. Die ermittelten Werte wurden über ein Single-Site-Interaktionsmodell gefittet und der, während der Messung auftretende, systematische Drift in der Basallinie über die Software automatisch korrigiert.

### 2.6 Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM)

Die *fluorescence lifetime imaging microscopy* (FLIM) beruht im Gegensatz zu anderen fluoreszenzmikroskopischen Verfahren nicht auf der Messung der Fluoreszenzintensität, sondern basiert auf der Detektion der Lebensdauer von angeregten Zuständen fluoreszierender Moleküle. Die bei der FLIM gemessene Fluoreszenz-Emission kann über Position, Zeitdauer der Emission, Polarisierung und Wellenlänge charakterisiert werden (Suhling et al., 2005). Dabei ist die Abnahme der Fluoreszenz abhängig von spezifischen Charakteristika des Fluorophors selbst, aber ebenso von seiner lokalen Umgebung. Unabhängig ist sie hingegen von der initialen Intensität der Emission und der Fotobleichung. Mit Hilfe des FLIM kann die Umgebung des Fluorophores auf Interaktionen mit anderen Molekülen, den lokalen pH, Brechungsindex, Ionen- oder Oxygen-Konzentrationen untersucht werden (Lakowicz, 1988; Suhling et al., 2005).

Die Fluoreszenzlebensdauer ( $T$ ) ist dabei die Zeit, welche ein Molekül nach der Anregung im angeregten Zustand verbleibt, bevor es unter Abgabe eines Photons in den Grundzustand zurückkehrt. Dem auftretenden Fluoreszenzabbau folgt die exponentielle Abnahme der Fluoreszenzintensität. Die Fluoreszenzlebensdauer ist umgekehrt proportional zur Summe der Zerfallsraten  $k$  für strahlende ( $r$ ) und nichtstrahlende ( $nr$ ) Prozesse.

$$1/T = \sum k_i \quad \text{oder} \quad T = 1 / (k_r + k_{nr})$$

Die Proben wurden mit einem kurzen optischen Puls angeregt und anschließend die Fluoreszenzdauer mit Hilfe der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (TCSPC) ausgewertet (Becker et al., 2004). Dabei erfolgte die Registrierung der Ankunftszeit

der einzelnen Photonen nach der Anregung. Die TCSPC besitzt ein sehr gutes Rausch-Signal-Verhältnis, eine hohe zeitliche Auflösung im Piko-Sekunden-Bereich und wurde bereits für die Detektion von geringen Shifts (Veränderungen) in der Konformation von Proteinen nach Einfügen von Mutationen genutzt (Ushakov et al., 2011).

Die Präparation von permeabilisierten Soleus- und Psoasmuskelfasern von Kaninchen, die Markierung der Cys-Aminosäuren Cys-67 und Cys-182 in den hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> Proteinen mit 7-diethylamino-3-((((2-iodoacetamido) ethyl) amino) carbonyl)-Coumarin und der Austausch der endogenen leichten Myosinketten gegen die gelabelten rekombinanten Proteine erfolgte wie bei Ushakov et al. 2011 beschrieben. Die FLIM-Untersuchungen der hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> Proben wurden in Relaxing-Solution durchgeführt. Zur Detektion der Fluoreszenz der Coumarin-Cys-markierten VLCs wurde das Leica TCS SP5 konfokal Mikroskop verwendet. Anschließend wurde die Abnahme der Fluoreszenz mit Hilfe der SPCImage Software (Becker und Hickl, Berlin) gefittet und ausgewertet.

Die Präparation und Messung der Muskelfasern erfolgte als Kooperation mit Dmitry Ushakov, Imperial College, London, UK.

### 2.7 Sorting Assay

Die Untersuchung der spezifischen Affinitäten beim Einbau von hVLC1 bzw. hVLC1<sup>E56G</sup> in das Sarkomer von neonatalen Ratten-Kardiomyozyten erfolgte über die Anwendung eines kompetitiven Sorting Assays. Dabei wurde cDNA von hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> über *HindIII* Schnittstellen in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1(+) eingefügt, in Top 10F' Zellen amplifiziert und mit dem Invisorb Plasmid Maxi Kit aufgereinigt. Die exogene cDNA wurde über Transfektion mit Hilfe von Lipofectamin in die Zellen eingebracht. Beide Formen des Proteins, die normale und die mutierte hVLC1, wurden somit in einer Kardiomyozyte von ihrer cDNA ko-exprimiert und konkurrierten um den Einbau in das Sarkomer. Die Auswertung mittels konfokaler Lasermikroskopie erfolgte mit Antikörpern gegen den myc- bzw. HIS-Tag der hVLC1 bzw. hVLC1<sup>E56G</sup> Proteine mit dem Axiovert 40 CFL.

### 2.7.1 Isolierung neonataler Kardiomyozyten

Die Isolierung und Kultivierung der neonatalen Kardiomyozyten erfolgte aus 1-3 Tage alten Sprague-Dawley Ratten wie bei Kott *et. al.* 1998 beschrieben. Die Zellen wurde von der Firma E.R.D.E. (Berlin) bezogen.

### 2.7.2 Kompetitives Sorting Assay von hVLC1 vs. hVLC1<sup>E56G</sup>

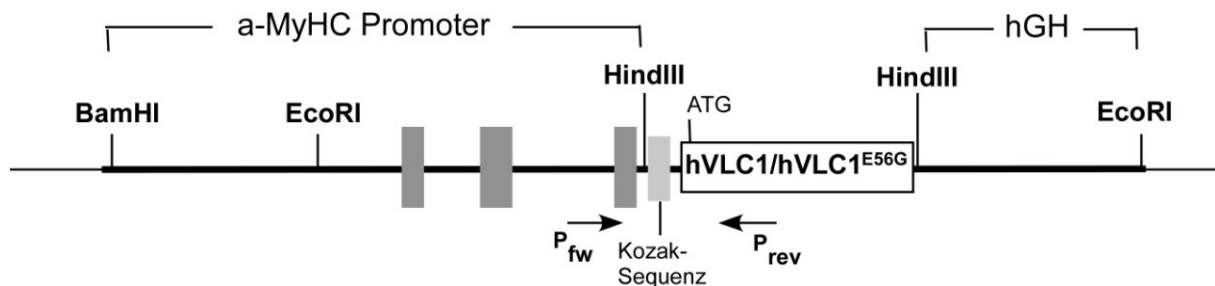
Die isolierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten wurden zu je  $10 \times 10^4$  Zellen/Well in eine 12-Well-Platte mit sterilen Menzel-Deckgläsern (15x15 mm) eingesät und für 18 Stunden (über Nacht) im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Anschließend wurde frisches Medium (1 ml SM20-I) gegeben. Pro Well wurden 1 µg Plasmid-cDNA von hVLC1 bzw. hVLC1<sup>E56G</sup> in 100 µl SM20-I aufgenommen und mit 4 µl Lipofectamin in 100 µl SM20-I gemischt (Endvolumen 200 µl), für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und zu den Zellen gegeben. Für Einzeltransfektionen wurde nur hVLC1 oder hVLC1<sup>E56G</sup> cDNA verwendet. Für Ko-transfektionen enthielt der komplette Mix beide cDNA-Komponenten. Zusätzlich wurden Negativ-Kontrollen zu jeder Transfektion mitgeführt.

Nach 6 Stunden Transfektionszeit im CO<sub>2</sub>-Inkubator wurde neues Medium ohne cDNA gegeben und die neonatalen Kardiomyozyten für weitere 12 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte mit je 1 ml 1fach PBS und die Fixierung der Zellen mit 3,7 % Formaldehyd für 10 min (RT). Auf drei weitere Waschschrte mit 1fach PBS (je 1 ml) folgte die Permeabilisierung der Zellen mit 0,5 % Triton-X-100/PBS (500 µl, 10 min) und zweimaliges weiteres Waschen mit 1fach PBS (1 ml, RT). Mit Hilfe einer Pinzette wurden die Menzel-Deckgläser mit den Kardiomyozyten aus den 12-Well-Platten entnommen und in einer feuchten Kammer platziert. Unspezifische Bindungen wurden durch Inkubation mit 0,2 % Fish-skin-Gelantine/PBS (200 µl) für 30 min blockiert. Die Inkubation mit 200 µl der primären anti-myc- bzw. anti-HIS-Antikörper (5 µg/ml) in 0,2 % Fish-skin-gelantine/PBS erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach 3 Waschschrten mit 0,1 % Nonidet NP40/PBS (500 µl, RT) wurde die Inkubation mit den sekundären Antikörpern Alexa-Fluor-488 und -568 in 200 µl (1 µg/ml) 0,2 %-skin-Gelantine/PBS in einer dunklen feuchten Kammer für 1 Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt. Darauf folgend wurde 3x mit 0,1 % Nonidet NP40/PBS gewaschen (200 µl) und der Nukleus mit Hoechst

33258 angefärbt (5 min, RT) bzw. bei Einzeltransfektionen die Lokalisation durch eine Gegenfärbung mit Myomesin (M-Bande) oder  $\alpha$ -Aktinin (Z-Bande) überprüft. Anschließend erfolgten nochmals 3 Waschschrte mit 1fach PBS (200  $\mu$ l, RT) und das luftblasenfreie Einbetten in Mowiol. Alle Schritte nach Inkubation der Zellen mit den fluoreszierenden sekundären Antikörpern wurden in einer dunklen Kammer vorgenommen. Fertige Präparate wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 40 CFL ausgewertet und bei -20 °C gelagert.

### 2.8 Generation der transgenen Mauslinien TGM/hVLC1 und TGM/hVLC1<sup>E56G</sup>

Das Konstrukt zur Generierung der transgenen Mauslinien TGM/hVLC1 und TGM/hVLC1<sup>E56G</sup> enthielt die komplette cDNA der humanen leichten Myosinkette (NP\_000249.1) in der normalen bzw. E56G mutierten Form. Die cDNA der hVLC1 war über eine Kozak-Sequenz (*upstream*) mit dem herzspezifischen 5,5 kb großen  $\alpha$ -MyHC-Promoter der Maus verbunden. Dieser umfasste die ersten drei nichtkodierenden Exons des  $\alpha$ -MyHC-Transkriptes. Sofort nach der hVLC1-Sequenz folgte (*downstream*) ein Teil (~ 600bp) des humanen Wachstumshormon-Genes (hGH), welches ein Polyadenylations-Signal (Poly-A) enthielt (Abb.11).



**Abb. 11: Schematische Darstellung des Konstrukts zu Generierung der transgenen Mauslinien.** Die hVLC1- oder hVLC1<sup>E56G</sup>-cDNA ist über eine Kozak-Sequenz mit dem  $\alpha$ -MyHC-Promoter verbunden, gefolgt von einem hGH-Polyadenylations-Signal. Wichtige Restriktionsschnittstellen und das Startcodon sind angegeben. Horizontale Pfeile  $\rightarrow$  P<sub>fw</sub> und P<sub>rev</sub> stellen die Primer für die Genotypisierungs-PCR der transgenen Mäuse dar.

Die verschiedenen Restriktionsschnittstellen, der alpha-MyHC-Promoter sowie das Poly-A-Signal des hGH-Genes lagen bereits im Vektor pBSII SK+ vor (alpha-MyHC clone 26 von Dr. J. Robins, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, OH, USA). Die Ligation von Kozak-Sequenz und hVLC1 bzw. hVLC1<sup>E56G</sup> cDNA in den Vektor

erfolgte über die *HindIII* Schnittstellen. Nach der Transformation in Top10F' Zellen wurden ÜN-Kulturen angelegt, aufgereinigt und das Konstrukt mittels Sequenzierung überprüft.

Mit *EcoRI* linearisiert ergab sich ein etwa 3000 bp großes Konstrukt, welches über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt und für die pronukleäre Mikroinjektion in befruchtete Eizellen von Donor-Mäusen (BL6/C57) genutzt wurde. Die befruchteten Eizellen wurden von Rezipienten-Mäusen ausgetragen.

Die Durchführung der pronukleären Injektion erfolgte als Dienstleistung der Transgenic Core Facility (TCF) des MDC. Die so erzeugten potentiellen transgenen Foundertiere wurden mittels PCR genotypisiert und positive Mäuse für die weitere Zucht und Verpaarung eingesetzt.

Tierlinien, die hVLC1 im Herzen exprimierten, wurden im Folgenden als TGM/hVLC1 oder hVLC1 Tiere, Mauslinien mit mutierter leichter Myosinkette als TGM/hVLC1<sup>E56G</sup> oder hVLC1<sup>E56G</sup> Tiere, bezeichnet. Transgene Jungtiere wurden bis zu einem Alter von 3 Monaten, wie unter 2.1.6. beschrieben, gehalten und anschließend in den Versuch genommen. Nach der Verwendung im Langendorff-Versuch wurden die Herzen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Diese Herzgewebeproben wurden für den Nachweis von hVLC1 oder hVLC1<sup>E56G</sup> mRNA im Tier mittels semiquantitativer RT-PCR und für die Myofibrillen-Präparation zur Untersuchung der Substitution der endogenen leichten Ketten im Tier verwendet.

### 2.8.1 Genotypisierung

Das durch Ohrmarkierung gewonnene Gewebe der transgenen Mäuse wurde eingesetzt, um mit Hilfe des DirectPCR Lysis Reagent, nach Angaben des Herstellers, genomische DNA zu isolieren. Zum Nachweis des transgenen Konstrukts im murinen Genom wurde ein Vorwärtsprimer im alpha-MyHC-Promoter und ein Rückwärtsprimer im Bereich der hVLC1 Sequenz entworfen und die PCR wie beschrieben durchgeführt (Tab.1 Primer 15/16, Abb. 11). Anschließend wurden die PCR-Produkte samt Positiv- und Negativkontrolle sowie Perfect Plus 1 kb Marker in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt und mit dem Bio-Rad GelDoc 2000

dokumentiert. Positive Tiere zeigten eine Bande bei 1000 bp. Bei negativen Tieren und der Negativkontrolle konnte keine Bande nachgewiesen werden.

### 2.8.2 mRNA Isolierung, Reverse Transkription und quantitative RT-PCR

Für die Isolierung zellulärer RNA aus dem Herzen transgener Mäuse (TGM/hVLC1 und TGM/hVLC1<sup>E56G</sup>) wurde das RNeasy Mini Kit nach Anleitung des Herstellers verwendet. Zur Bestimmung der mRNA-Konzentration wurde der ND-1000 genutzt. Die cDNA Synthese aus isolierter mRNA erfolgte mit dem High-Capacity DNA Reverse Transcription Kit. Dabei wurde einzelsträngige mRNA mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) in cDNA umgeschrieben (reverse Transkription). Dazu wurden 2 µg Gesamt-RNA in ein Reaktionsgefäß pipetiert und mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt. Zu der Probe wurde anschließend 10 µl Mastermix (Tab. 5) hinzugegeben und der Ansatz im DNA-Thermal-Cycler inkubiert.

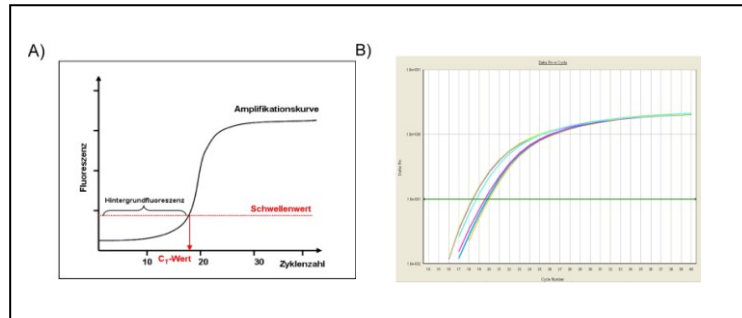
**Tab. 5: Mastermix für den PCR-Ansatz der reversen Transkription und verwendetes Cyclerprogramm.**

Substanz	Endkonzentration im Mastermix	Cyclerprogramm	
RT Buffer	1fach	10 min	25 °C
dNTPs	8 mM	120 min	37 °C
Reverse Transkriptase	50 Units	5 min	85 °C
Primer	2,0 µM	∞	4 °C
H <sub>2</sub> O	auf 10 µl		

Die erhaltene cDNA wurde im Verhältnis 1:20 mit H<sub>2</sub>O (20 µl Probe + 180 µl H<sub>2</sub>O) verdünnt, bei -20 °C gelagert und diente als Template für die anschließende semiquantitative *TaqMan* Echtzeit PCR (qRT-PCR). Die bei der qRT-PCR verwendete Sonde (Oligonukleotidprimer Nr. 23) war mit einem Quencher und einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff markiert, wobei die Fluoreszenz des Fluorophors durch den Quencher mittels strahlungsfreier Energieübertragung (FRET) unterdrückt wurde. Durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der *Taq*-Polymerase wurde während der qRT-PCR-Zyklen das 5'-Ende der Sonde abgebaut und die Reporter-



Fluoreszenz im ansteigendem Maße freigesetzt. Als  $C_t$ -Wert wurde dann die Zykluszahl angegeben, bei der die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant überstieg (Abb. 12). Je mehr Ziel-cDNA zu Beginn der Messungen vorlag, desto eher wurde der  $C_t$ -Wert erreicht.



**Abb. 12: Amplifikationsdiagramm einer qRT-PCR.** A) Schematische Darstellung eines Amplifikationsdiagrammes. Die Fluoreszenz der Proben wird gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragen.  $C_t$  = threshold cycle = Zyklus in der die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. B) Amplifikationsdiagramm der transgenen Mauslinien (Linien 3552, 3566, 7385). Der  $C_t$ -Wert der Proben (grüne Linie) liegt zwischen 18-19 Zyklen.

Die Auswertung des *TaqMan* erfolgte über die relative Quantifizierung mit Hilfe von Eichreihen und der Normierung auf einen internen Standard (*housekeeper*). Dabei wurde die mRNA Expression der untersuchten Konstrukte auf die Expression eines parallel mitgeführten Standards normiert. *Housekeeping*-Gene sollten unabhängig von experimentellen Bedingungen (*in vitro*) oder Krankheiten (*in vivo*) im untersuchten Gewebe konstant in großer Menge exprimiert werden. Als Standard wurde in dieser Arbeit die 18S-rRNA genutzt. Für die Erstellung der Eichreihen (C-Wert versus log ng gesamt RNA) von hVLC1 bzw. hVLC1<sup>E56G</sup> sowie für den Standard 18S wurden die cDNA-Proben der vier verschiedenen TGM-Linien vermischt und fünf serielle 1:2 Verdünnungen (1,25 – 20 ng RNA) erstellt und der  $C_t$ -Wert bestimmt. Anschließend wurden die cDNA-Proben der verschiedenen transgenen Mauslinien einzeln gemessen, der  $C_t$ -Wert und damit die Ausgangs-RNA-Menge bestimmt und auf den Housekeeper normiert. Zusätzlich wurde bei allen Versuchen als Negativkontrollen ein Ansatz ohne cDNA bzw. cDNA ohne Zielkonstrukt (BL6/C57 Wildtyp-Maus cDNA) mitgeführt.

Die Experimente erfolgten mit dem *TaqMan*® Gene Expression Master Mix im AB 7500 Fast Real-Time PCR System. Die Reaktionsansätze wurden in MicroAmp Fast Optical 96-Well Platten pipettiert, 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert und anschließend

gemessen. Jede Messung von cDNA-Proben der transgenen Linien zur Bestimmung der  $C_t$ -Werte wurde doppelt durchgeführt und wiederholt. Die Endkonzentrationen im einzelnen Reaktionsansatz setzten sich folgendermaßen zusammen:

Tab. 6: Reaktionsansatz für die quantitative Echtzeit PCR und verwendetes Cyclerprogramm.

Substanz	Endkonzentration	Cyclerprogramm	
2x uni MM Buffer	1fach	2 min	50 °C
Primer hVLC1 fw TaqMan	300 nM	10 min	95 °C
Primer hVLC1 rev TaqMan	300 nM	15 sek	95 °C
Sonde	150 nM	1 min	60 °C
cDNA	10 ng	40 Zyklen	
H <sub>2</sub> O	auf 10 µl		

Für die relative Quantifizierung der hVLC1 mRNA Startmenge wurde über den  $C_t$ -Wert mit Hilfe der jeweiligen Eichreihe die Ausgangskonzentration an hVLC1 bzw. 18S mRNA berechnet. Jede Probe wurde auf den Standard 18S normiert und die Ergebnisse als n-fache Expression von hVLC1 bzw. hVLC1<sup>E56G</sup> im Verhältnis zu 18S angegeben und wie folgt berechnet:

relative hVLC1 mRNA Expression (normiert auf 18S) = Ausgangskonzentration hVLC1 mRNA / Ausgangskonzentration 18S mRNA.

### 2.8.3 Kontrolle der Substitution auf Proteinebene in Myofibrillen

Zusätzlich zur Genotypisierung und dem Nachweis von hVLC1 oder hVLC1<sup>E56G</sup> mRNA im Tier wurden die Substitution der endogenen essentiellen leichten Myosinketten der Maus durch die humane Form und der Einbau in die Myofibrillen überprüft. Die Erzeugung eines humanspezifischen Antikörpers war nicht möglich, da alle in der hVLC1 Sequenz vorkommenden Aminosäuren ebenfalls in der murinen Form vorhanden waren. Somit wurde immer auch die endogene mausspezifische Form vom VLC1 im Westernblot detektiert. Da jedoch die humane leichte Kette neun Aminosäuren weniger umfasst als die murine Form (Anhang 6.3), konnten beide leichte Ketten über ihr Laufverhalten mittels SDS-Page in einem 12 %igen Gel

getrennt und ihre prozentualen Anteile mit Hilfe der ImageJ Software ermittelt werden.

Die Präparation der Herzen aus Tieren der transgenen Mauslinien TGM/hVLC1 und TGM/hVLC1<sup>E56G</sup> erfolgte wie unter Abschnitt 2.10.1 beschrieben. Die anschließende Aufarbeitung der Myofibrillen aus dem Gewebe wurde mit Modifikationen nach Solaro et al. 1971 durchgeführt. Dabei wurden circa 50 mg Herzgewebe (linker Ventrikel) in ein 1,5 ml Eppendorff-Reaktionsgefäß überführt, 200 µl MyF-Puffer 1 (4faches Volumen der Probe) hinzugegeben und für 1 min mit dem Apollo 65000 homogenisiert. Anschließend wurde die Probe bei 17300xg in der Eppendorff Centrifuge 5417R bei 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet in 200 µl MyF-Puffer 2 (ursprüngliches Probenvolumen) resuspendiert, erneut homogenisiert und bei 750xg für 15 min zentrifugiert. Die Sequenz von Resuspension, Homogenisieren und Zentrifugation wurde 4x wiederholt, danach erfolgte die Resuspension in 200 µl MyF-Puffer 3 mit nachfolgender Zentrifugation bei 750xg für 15 min. Anschließend wurde das Pellet in 500 µl (10faches Pellet/Gewebe-Volumen) MyF-Puffer 4 aufgenommen und wieder bei 750xg für 15 min abzentrifugiert. Die Behandlung mit dem MyF-Puffer 4 wurde 1x wiederholt. Die resultierenden Pellets wurden 4x mit 500 µl MyF-Puffer 2 gewaschen, um Triton-X-100 zu entfernen und die purifizierten Myofibrillen in 250 µl MyF-Puffer 2 aufgenommen. Alle Schritte der Myofibrillen-Präparation erfolgten auf Eis und in vorgekühlten Zentrifugen (4 °C).

In der darauf folgenden SDS-Page wurden die Myofibrillen-Proben der einzelnen transgenen Tiere (TGM/hVLC1 oder TGM/hVLC1<sup>E56G</sup>) oder von Wildtyp-Negativ-Kontrollen (C57/BL6 Mäuse) in einem 12 %igen Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit dem Bio-Rad GelDoc 2000 dokumentiert. Die Auswertung der Substitution der endogenen ELCs der Maus durch die humane Form des Proteins erfolgte mit dem Software Programm Image J.

### 2.8.4 Alpha- und beta-Myosin Verteilung

Im Herzen erfolgt die Expression der schweren Myosinkette von zwei verschiedenen Genen (alpha- bzw. beta-Myosin) mit unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften. Im gesunden Herzen der Maus wird im Ventrikel die  $\alpha$ -Myosin

schwere Kette (alpha-MyHC, 230 kDa) exprimiert. Bei Herzversagen oder hypertrophen bzw. dilatativen Erkrankungen kann eine Hochregulation der Expression der  $\beta$ -Myosin schweren Kette (beta-MyHC, 230 kDa) nachgewiesen werden (Krenz et al., 2004). Zur Analyse der alpha- und beta-Myosinverteilung im Herzen der transgenen Mäuse im Vergleich zu C57/BL6 Wildtyp-Mäusen wurden aufgereinigte Myofibrillen nach dem Protokoll von Carraro et al. 1983 in einem 5 %igen SDS-Gel mit 25 % Glycerol aufgetrennt, mit Coomassie-Blau angefärbt und mit dem Gel-Dok 2000 dokumentiert.

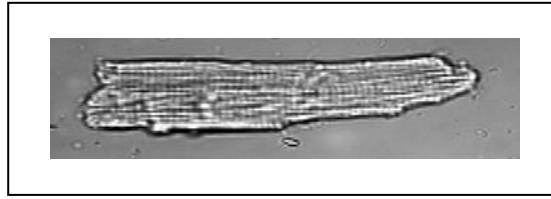
### 2.8.5 Echokardiographie

Drei Monate alte männliche transgene Tiere der TGM/hVLC1 und TGM/hVLC1<sup>E56G</sup> Linien sowie nichttransgene Wurfgeschwister wurden mittels Echokardiographie untersucht. Dabei erfolgte die Bestimmung wichtiger morphologischen Parameter des Herzen, wie der Größe des interventrikularen Septums (IVS), der hinteren Wand des linken Ventrikel (LVPW) und des Durchmessers des linken Ventrikels (LV) jeweils in Systole und Diastole. Der Weiteren wurden die prozentuale Herzverkürzung (*fractional shortening*), Herz- zu Körpergewichtverhältnis (HW/BW) und die Herzrate (HR) dokumentiert. Dazu wurden die Tiere kontinuierlich über eine Inhalationsnarkose mit Isofluran betäubt und mit dem Vevo2100 (VisualSonics, Toronto, Kanada) untersucht. Die Durchführung der Echokardiographie erfolgte als Dienstleistung des MDC.

### 2.9 Zell-Verkürzungsmessungen an isolierten adulten Kardiomyozyten

Die Isolierung der adulten murinen Kardiomyozyten aus Herzen von 12-14 Wochen alten männlichen Tieren der TGM-Linien erfolgte wie bei Alvarez et al. 2010 beschrieben.

Nach erfolgter Präparation wurden die Zellen in M199\* zur Anheftung an den mit Laminin beschichteten Kammerboden für 3 h im CO<sub>2</sub> Inkubator kultiviert. Die Messung wurde anschließend nur an vitalen, rechteckigen Kardiomyozyten (Abb. 13) mit einem Sarkomerabstand über 1,7  $\mu$ m durchgeführt.



**Abb. 13: Lichtmikroskopische Aufnahme einer adulten Kardiomyozyte (40-fach vergrößert).** Die Präparation erfolgte aus dem Herzen einer männlichen 3 Monate alten Maus der TGM/hVLC1-Linie.

Die Zell-Verkürzungsamplitude wurde mit Hilfe des Kontraktilitäts- und Fluoreszenzsystem mit zugehöriger Software (IonWizard) der Firma IonOptix gemessen und ausgewertet. Die Kontraktion der Kardiomyozyten wurde im elektrischen Feld bei 30 °C durch bipolare Pulse von 1 Hz bei 20 Volt für 5 Millisekunden ausgelöst. Die Aufzeichnung umfasste eine kurze Einschlagphase und anschließend eine stabile Phase für mindesten 5 Minuten. Zur Auswertung wurden je 30 Amplituden aus dem stabilen Bereich gemittelt und die prozentuale Verkürzung zu Zelllänge ermittelt und verglichen.

### 2.10 Das isoliert perfundierte Herz nach Langendorff

Das System des retrograd durch die Aorta perfundierten isolierten Herzens, 1895 von Oskar Langendorff entwickelt (Langendorff, 1895), ist methodisch bis heute grundsätzlich unverändert geblieben (Skrzypiec-Spring et al., 2007). Von Untersuchungen über herzphysiologische Parameter, wie Myokardfunktion, Elektrophysiologie und die Entwicklung von Arrhythmien, über Koronargefäßfunktion und -regulation bis hin zu pathophysiologischen Zuständen bei Erkrankungen, wie Hypertension, Diabetes, Herzinsuffizienz und Ischämie-Reperfusion, kann das Langendorff-Modell genutzt werden. Durch die Entwicklung von transgenen bzw. *knock-out/knock-in* Tiermodellen stellt es eine wichtige Methode für biochemische, physiologische und pharmakologische Untersuchungen, außerhalb eines Organismus, ohne störende humorale oder nervöse Einflüsse, jedoch mit vergleichbaren und regulierbaren physiologischen Arbeitsbedingungen, dar.

Im Langendorff-System besteht die Möglichkeit, Messungen unter konstantem Perfusionsdruck oder auch unter konstantem Koronarfluss vorzunehmen (Bell et al., 2011). Die dabei erfassten physiologischen Parameter des Herzens waren

linksventrikulärer Druck (LVD und  $\Delta$ LVD), Perfusionsdruck (PD), Koronarfluss (KF) und ein Elektrokardiogramm (EKG). Mit Hilfe dieser Parameter konnten die transgenen Mauslinien TGM/hVLC1 und TGM/hVLC1<sup>E56G</sup> auf ihre funktionelle Herzleistung hin untersucht werden. Die hier verwendete HSE-Apparatur wurde speziell für Experimente an isolierten Herzen kleiner Nagetiere, wie Mäuse, entwickelt.

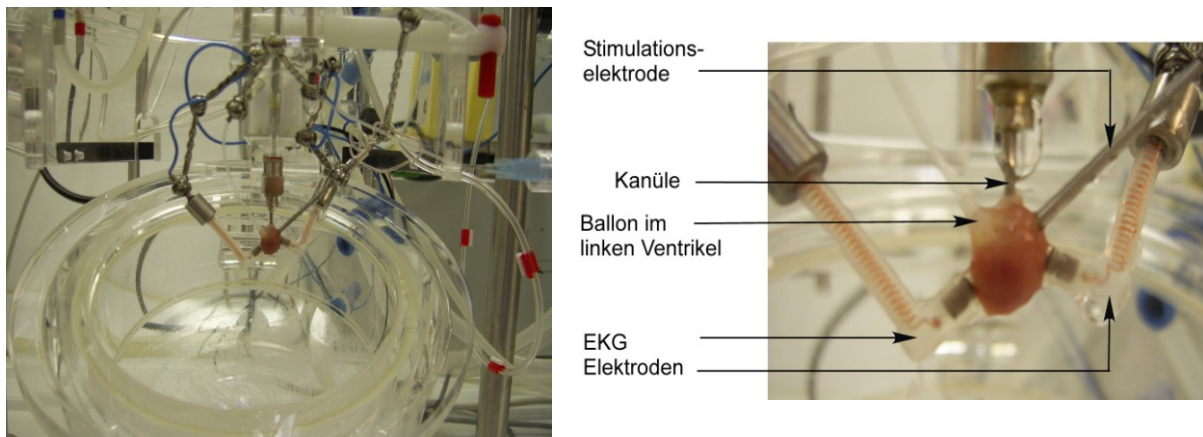
### 2.10.1 Präparation und Perfusion muriner Herzen

Das gesamte Langendorff-System wurde vor Benutzung auf Luftblasen kontrolliert, da diese die Erfassung des LVD stark beeinträchtigten. Das Eindringen von Luftblasen in das Herz oder in die Koronargefäße wurde durch Präparation unter Lösung und die im Langendorff-System integrierte Luftblasenfalle verhindert. Die Erwärmung (37 °C) und Begasung des Krebs-Henseleit-Puffers (KHP) mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) begann 45 min vor dem Start der Versuche, um die Einstellung des pH auf 7,4 und die Oxygenierung der Lösung zu ermöglichen und wurde während des gesamten Versuches aufrecht erhalten. Alle Versuche wurden unter einem konstanten Perfusionsdruck von 60 mmHg durchgeführt.

Die Anästhesierung 12-14 Wochen alter männlicher Mäuse erfolgte durch die intraperitoneale (i.p.) Injektion von 25 mg/kg Xylazin und 130 mg/kg Ketamin (Arras et al., 2001). Zusätzlich wurden 100 µl Heparin (=500IE) i.p. injiziert, um die Blutgerinnung und Thrombenbildung zu verhindern. Anschließend wurde das genaue Gewicht der in Narkose befindlichen Tiere ermittelt. Zur Entnahme des Herzens wurden die Mäuse in der Präparationsschale in Rückenlage fixiert. Das Brustfell wurde mit Alkohol desinfiziert und somit gleichzeitig umherfliegendes Fell vermieden. Um den Brustkorb zu öffnen, wurde ein Hautschnitt am Ende des Sternums ausgeführt und das Fell Richtung Kopf abgelöst. Anschließend erfolgte die Durchtrennung der Abdominalmuskulatur, des Diaphragmas sowie der Rippen und die Freipräparation des Herzens. Das schlagende Herz wurde mit einer Pinzette am Aortenbogen ergriffen, mit Hilfe einer Schere entnommen und sofort in eisgekühlten, begasten Krebs-Henseleit-Puffer überführt, um mögliche ischämische Schäden zu vermeiden. Das Gewicht der Herzen wurde ermittelt und überflüssiges Gewebe wie Fett, Bindegewebe o.ä. entfernt. Die freipräparierte Aorta wurde unter kalter Lösung

auf eine Kanüle gezogen und mit Ethibond Faden fixiert. Damit die Versorgung des Herzens über die Herzkranzgefäße gewährleistet war, durfte es keinesfalls zu einer Verlegung oder Blockierung der Aortenklappe durch die Kanüle kommen. Die Kanüle war mit einer befüllten 1 ml Spritze verbunden, so dass das Herz vor der Eröffnung des linken Ventrikels mit KHP gespült werden konnte, um Blut aus den Ventrikeln zu entfernen und ein besseres Sichtfeld zu ermöglichen. Zusätzlich konnte somit überprüft werden, ob durch das Einführen der Kanüle Koronargefäße verlegt worden waren. Mit Hilfe einer Mikroschere wurde vom linken Vorhof ein kleiner Einschnitt in den linken Ventrikel vorgenommen, durch den später der Ballon eingeführt wurde. Über die Kanüle wurde das Herz mit der Langendorff-Perfusionsapparatur verbunden, sofort mit erwärmtem KHP retrograd perfundiert (37 °C) und in den eröffneten linken Ventrikel ein mit H<sub>2</sub>O befüllter Ballon mit angeschlossenem Druck-Transducer eingebracht (Abb. 14). Die Zeit zwischen der Entnahme des Herzens und dem Start der Perfusion im Langendorff-System war möglichst kurz zu halten (2-3 min). Der Befüllungszustand des selbst hergestellten Ballons (Ballon-Kit für Maus, HSE) konnte extern festgelegt werden. Zur Einführung in den linken Ventrikel wurde er entleert. Im Versuch wurde ein enddiastolischer Druck von 9 – 11 mmHg eingestellt.

Nach einer kurzen Stabilisierungsphase (5 min) erfolgte die elektrische Stimulierung des Herzens mit einer Frequenz von 414 Schlägen pro Minute mit Hilfe einer Elektrode, die in der Nähe des Sinusknotens aufgesetzt wurde. Die Aufzeichnung wurde nach dem Erreichen einer stabilen Phase nach circa 20 - 30 Minuten für weitere 15 Minuten durchgeführt. Der mit dem Druckwandler gekoppelte Ballon erlaubte die kontinuierliche Aufzeichnung von linksventrikulärem Druck (LVD) und Herzrate (HR). Zusätzlich wurden der Koronarfluss (KF) und ein Elektrokardiogramm (EKG) dokumentiert. Aus den registrierten LVD-Signalen konnten die Kontraktions- und die Relaxationsgeschwindigkeit bestimmt werden. Die Darstellung und Auswertung der erfassten Daten erfolgte mit der HSE-Software.



**Abb. 14: Langendorff Apparatur mit retrograd perfundiertem Mäuseherz.** Die Aorta wurde an der Kanüle fixiert und das Herz retrograd perfundiert. Über die Stimulationselektrode erfolgte die elektrische Stimulation mit 414 Schlägen pro Minute. LVP und Herzrate wurden über den Ballon im linken Ventrikel, EKG über die EKG-Elektroden, registriert.

### 2.11 Statistische Auswertungen

Alle statistischen Auswertungen erfolgten mit der GraphPad Prism 5 Software (GraphPad Software Inc, La Jolla, USA). Angegeben sind Mittelwerte mit SEM (*Standard Error of Mean*) und wenn vorhanden die Signifikanz (unpaired, two-tailed Students t-Test; mit \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

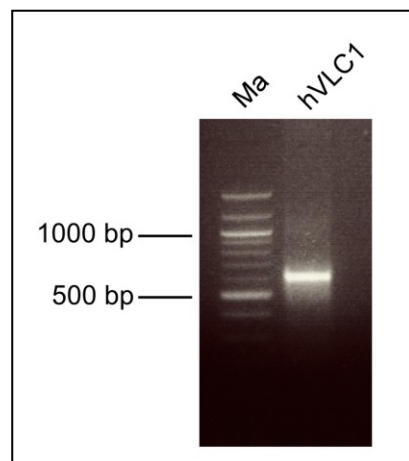


## 3. Ergebnisse

### 3.1 Molekularbiologische und mikrobiologische Ergebnisse

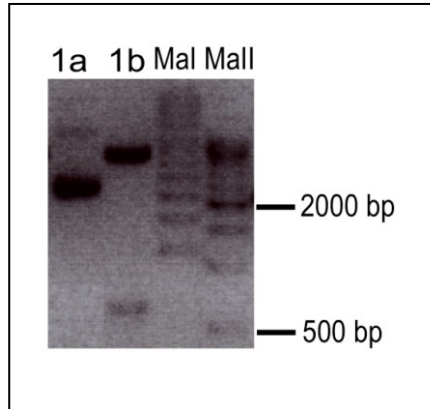
#### 3.1.1 Erstellung der Konstrukte von hVLC1

Zu Beginn der Arbeit erfolgte die Amplifikation der cDNA der humanen ventrikulären essentiellen leichten Myosinkette (hVLC1) über die Primer Nr. 1 und Nr. 2 aus aufgereinigter Plasmid-DNA des full-length cDNA clones“-IRAUp969E0154D (MYL3, Myosin, light chain 3, alkali, ventricular, NP\_000249.1) mittels PCR. Nach Optimierung der PCR ergab sich eine Bande bei 606 bp ohne unspezifische Nebenprodukte. Abbildung 15 zeigt das hVLC1 PCR-Produkt aufgetragen auf einem 0,8 %igen Agarose-Gel.



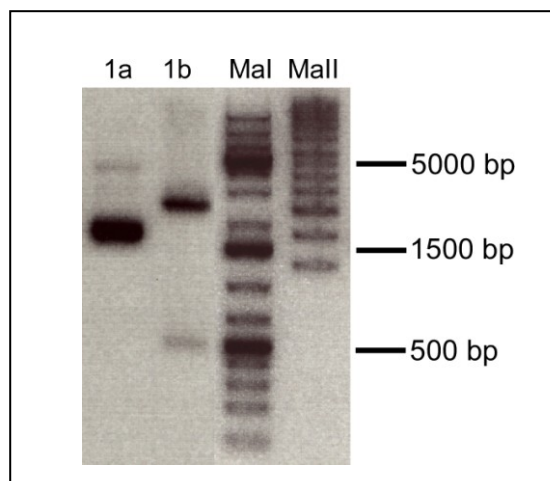
**Abb. 15: 0,8%iges Agarose-Gel mit PCR-Produkt hVLC1.** Dargestellt ist die 606 bp große hVLC1 Bande, verwendete Primer Nr. 1 und Nr. 2, Ma – 100 bp DNA Marker.

Das hVLC1 PCR-Produkt wurde anschließend zur Ligation in den Zwischenklonierungsvektor pCR2.1 (3,9 kb) und Transformation in Top10 F' Zellen verwendet. Erhaltene Klone wurden mittels Restriktionsanalyse mit *HindIII* auf die Aufnahme des hVLC1 Inserts überprüft und positive Klone über Sequenzierung bestätigt. Abbildung 16 zeigt den erfolgreichen Verdau eines positiven pCR2.1 Vektors mit hVLC1 Insert, wobei 1a den unverdauten Klon darstellt, während bei 1b durch den Verdau mit *HindIII* Vektor und hVLC1 Insert getrennt und linearisiert wurden.



**Abb. 16: 0,8 %iges Agarosegel mit Restriktionsverdau (*HindIII*) von hVLC1 im pCR2.1 Vektor.** 1a) pCR2.1 Vektor mit Insert unverdaut, 1b) pCR2.1 Vektor und Insert mit *HindIII* verdaut, Mal – Supercoiled DNA Marker, Mall – XVII DNA Marker, Größenangaben beziehen sich auf Mall.

Das über die *HindIII* Schnittstellen aus dem pCR2.1 Vektor isolierte hVLC1 Insert wurde nach der Aufreinigung aus dem Agarosegel in die linearisierten eukaryotischen Expressionsvektoren pRSETA (2,9 kb) bzw. pET28a (5,4 kb) ligiert. Die Aufnahme des Insert wurde über einen Restriktionsverdau mit *HindIII* und die erneute Sequenzierung kontrolliert. Abbildung 17 zeigt jeweils den unverdauten (1a) bzw. verdauten (1b) positiven Klon für die Klonierung von hVLC1 cDNA in den pRSETA Vektor.



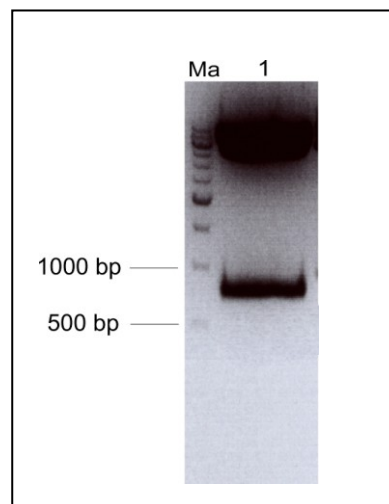
**Abb. 17: 0,8 %iges Agarosegel mit Restriktionsverdau (*HindIII*) von hVLC1 im pRSETA Vektor.** 1a) pRSETA Vektor mit Insert unverdaut, 1b) pRSETA Vektor und Insert mit *HindIII* verdaut, Mal –, GeneRuler 1 kb Plus DNA Marker, Mall – Supercoiled DNA Marker, Größenangaben beziehen sich auf Mal.

Anschließend wurde die aufgereinigte Plasmid-DNA der positiven Klone in BL21-CodonPlus(DE3)-RIL Zellen transformiert und das rekombinante Fusionsprotein hVLC1 mit N-terminalem HIS-Tag exprimiert.

Das Einfügen der mit Hypertrophie assoziierten Missense-Mutationen E56G, A57G, E143K, M149V und R154H in die hVLC1 cDNA wurde, wie unter 2.2.4 beschrieben, durchgeführt und mittels Sequenzierung bestätigt. Von positiven Konen wurden Glycerolstocks angelegt und bei -80 °C gelagert. Die Expression des rekombinanten hVLC1 Proteins erfolgte wie unter 2.2.5 beschrieben.

#### 3.1.2 Erstellung des r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup> Konstruktes

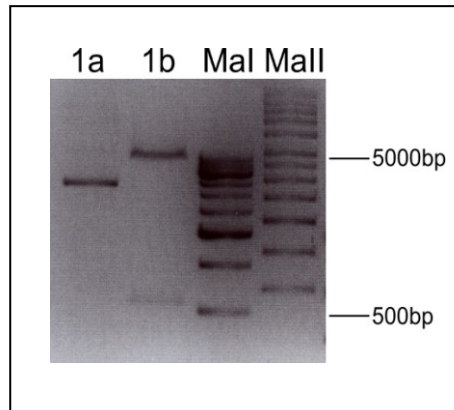
Die cDNA von r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub> lag bereits zu Beginn der Arbeit im pCR2.1 Vektor vor und konnte sofort über den Restriktionsverdau mit *Xho*I isoliert und, nach erfolgter Agarose-Gelaufreinigung, in den eukaryotischen Expressionsvektor pGEX-4T-1 (4,9 kb) mit N-terminalem GST-Tag ligiert werden. Abbildung 18 zeigt den Verdau von r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub> mit dem Restriktionsenzym *Xho*I aus dem pCR2.1 Vektor mit einer Bande bei circa 750 bp.



**Abb. 18: 0,8 %iges Agarosegel mit Restriktionsverdau (*Xho*I) von r $\beta$ -MyHC im pCR2.1 Vektor. 1) pCR2.1 Vektor und r $\beta$ -MyHC Insert mit *Xho*I verdaut, Ma – XVII DNA Marker.**

Die aus dem Gel aufgereinigte cDNA von r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub> wurde für die Ligation in den mit *Xho*I linearisierten pGEX-4T1 Vektor verwendet. Erhaltene Klone wurden über Restriktionsverdau mit *Xho*I und Sequenzierung überprüft. Abbildung 19 zeigt einen positiven Klon in unverdauter (1a) und verdauter (1b) Form. Dargestellt sind

Vektor mit Insert in ringförmiger (supercoiled) DNA (1a) sowie die mit *XhoI* verdaute linearisierte Form mit pGEX-4T1 Vektor bei rund 5000 bp und das r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub> Insert bei 750 bp.



**Abb. 19: 0,8 %iges Agarosegel mit Restriktionsverdau (*XhoI*) von r $\beta$ -MyHC im pGEX-4T1 Vektor.** 1a) pGEX-4T1 Vektor mit Insert unverdaut, 1b) pGEX-4T1 Vektor und r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub> Insert mit *XhoI* verdaut, Mal - XVII DNA Marker, Mall - Supercoiled DNA Marker, Größenangaben beziehen sich auf Mal.

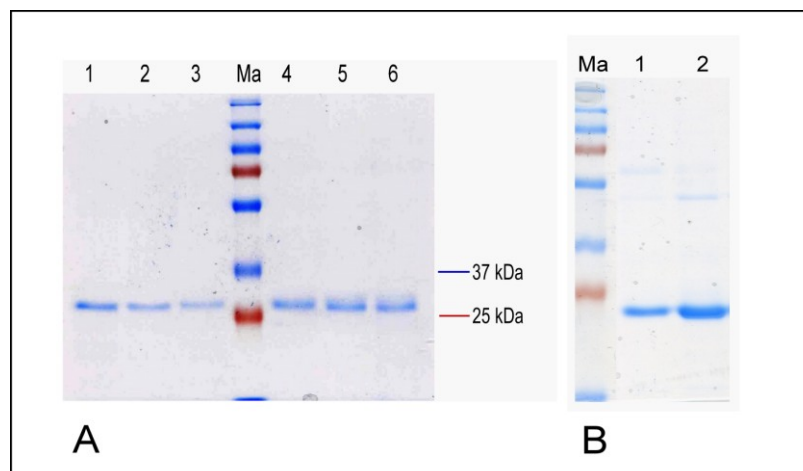
Die Plasmid-DNA eines über Sequenzierung bestätigten positiven Klon wurde in BL21-CodonPlus(DE3)-RIL Zellen transformiert und, wie unter 2.2.5 beschrieben, exprimiert. Von positiven Klonen wurde ein Glycerolstock angelegt und bei -80 °C gelagert.

Die Eliminierung des zweiten IQ Motivs (RLC Bindungsstelle) in der Halsdomäne der r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub> mittels eines Alanin-Scans wurde, wie unter 2.2.4 beschrieben, durchgeführt und mittels Sequenzierung bestätigt. Die Verwendung der cDNA der schweren Myosinkette der Ratte erfolgte, da das IQ1 Motiv zur Bindung der leichten Ketten homolog bei Ratte und Mensch vorhanden ist (Anhang 6.3).

#### **3.1.3 hVLC1, r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub> und r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup> Proteine lassen sich im SDS-Gel und Westernblot nachweisen**

Das rekombinante Fusionsprotein hVLC1 und die fünf mutierten Formen hVLC1<sup>E56G</sup>, hVLC1<sup>A57G</sup>, hVLC1<sup>E143K</sup>, hVLC1<sup>M149V</sup> und hVLC1<sup>R154H</sup> wurden im eukaryotischen Expressionsvektor pRSETA sowie hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> zusätzlich im eukaryotischen Expressionsvektor pET28a in *E.coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL Zellen exprimiert. Die Aufreinigung erfolgte, wie unter 2.2.5 beschrieben, mittels

Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose Säulen über den N-terminalen HIS-Tag der Proteine. Abbildung 20 zeigt die aufgereinigten hVLC1 Proteine nach einer 12% SDS-Gel-Elektrophorese und Färbung mit Coomassie Blau. In 20A sind dabei die N-terminal HIS-getaggen hVLC1, hVLC1<sup>E56G</sup>, hVLC1<sup>A57G</sup>, hVLC1<sup>E143K</sup>, hVLC1<sup>M149V</sup> und hVLC1<sup>R154H</sup> Proteine im pRSETA Vektor dargestellt, während 20B die ebenfalls N-terminal HIS-getaggen hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> Fusionsproteine im pET28a Vektor zeigt. Als Marker wurde der Precision Plus Protein Standards Dual Color mitgeführt. Der Größenunterschied der hVLC1 bzw. hVLC1<sup>E56G</sup> Proteine zwischen 20A und 20B beruht auf den verschiedenen Vektoren, in denen sie vorlagen. Der pRSETA Vektor enthielt, wie in 2.2.5 beschrieben, im Gegensatz zum pET28a Vektor, einen 38 AS-großen Spacer (Abstandshalter) zwischen dem N terminalen HIS-Tag und dem Startcodon des Proteins. Dadurch entstand ein rund 28 kDa großes Fusionsprotein (21 kDa hVLC1 + 7 kDa HIS-Tag). Für die Expression von hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> im pET28a Vektor fiel das Protein aufgrund des nicht vorhandenen AS-Spacers mit circa 23 kDa entsprechend kleiner aus (21 kDa hVLC1 + 2 kDa HIS-Tag).

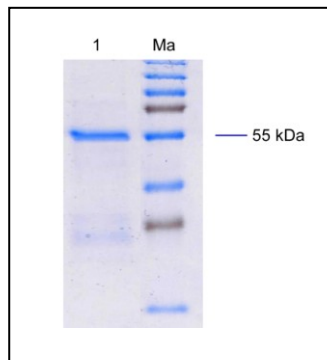


**Abb. 20: 12 %iges SDS-Gel mit aufgereinigten hVLC1 Proteinen mit Coomassie Blau Färbung.** A) hVLC1 im HIS-Tag pRSETA Vektor (Bahn 1) und mutierte Formen (E56G, A57G, E143K, M149V, R154H; Bahnen 2-6); B) hVLC1 mit HIS-Tag pET28a Vektor, Bahn 1 - hVLC1, Bahn 2 – mutierte hVLC1<sup>E56G</sup> Form, Ma - Precision Plus Protein Standards Dual Color.

Für die weiteren Untersuchungen zum Bindungsverhalten zwischen hVLC1 und der schweren Kette von Myosin wurden die Fusionsproteine rß-MyHC<sub>664-915</sub> und rß-MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup> im pGEX-4T1 Vektor mit einem N-terminalen GST-Tag exprimiert. Die Aufreinigung erfolgte über Glutathion-Sepharose-4B Säulen.

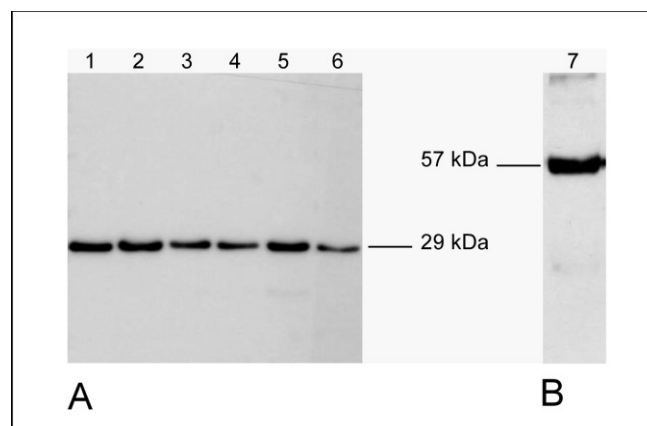
### 3. Ergebnisse

Abbildung 21 zeigt ein 12 %iges SDS-Gel mit dem sauberen rund 57 kDa großen r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup> Protein (28 kDa r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup> + 29 kDa GST-Tag).



**Abb. 21: 12 %iges SDS-Gel mit r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup> Fusionsprotein (Coomassie Blau Färbung) und Precision Plus Protein Standards Dual Color Marker.**

Mittels Westernblotanalyse konnten sowohl alle hVLC1 Proteine in normaler und mutierter Form als auch die r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub> bzw. r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup> Fusionsproteine über sekundäre Antikörper gegen ihren HIS- bzw. GST-Tag bestätigt werden. Es handelte sich in allen Fällen um die korrekten Proteine ohne störende Nebenprodukte. Abbildung 22 zeigt in A die hVLC1 Fusionsproteine, nachgewiesen mit einem anti-HIS-Antikörper. In Abbildung 22B ist das r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup> Fusionsprotein mit Hilfe eines anti-GST-Antikörpers dargestellt.



**Abb. 22: Westernblot von hVLC1 normale und mutierte Formen und r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup> mit anti-HIS- bzw. anti-GST-Antikörpern. A) hVLC1 mit HIS-Tag (Bahn 6) und mutierte Formen (E56G, A57G, E143K, M149V, R154H; Bahnen 1-5); B) r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup> Fusionsprotein mit GST-Tag (Bahn 7); 1 $\mu$ g pro Bahn aufgetragen.**

### 3.2 r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup> weist eine gestrecktere Konformation als r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub> auf

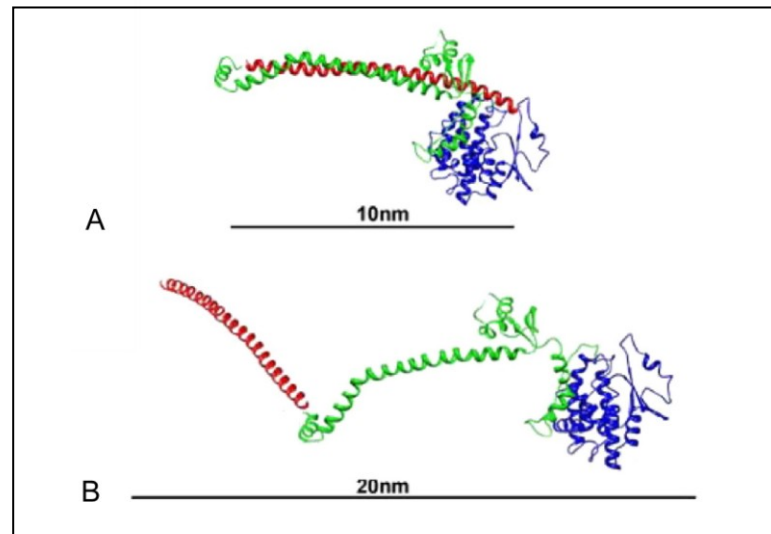
Die Ultrazentrifugation, durchgeführt von Prof. Joachim Behlke (MDC, Berlin), erfolgte mit den rekombinanten Fusionsproteinen r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub> und r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup>, wie unter 2.3 beschrieben. Die Ergebnisse der Untersuchung und der Vergleich der Proteine miteinander sind in Tabelle 7 dargestellt.

**Tab. 7: Resultate der Sedimentations-Geschwindigkeits-Zentrifugation von r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub> und r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub>IQ<sup>ala4</sup>.** S<sub>20,w</sub> - Sedimentationskoeffizient in Svedberg Units; D<sub>20,w</sub> - Diffusionskoeffizient, M – Molekulare Masse, (f/f<sub>0</sub>)<sub>total</sub> – *frictional ratio* (beschreibt die Form des Moleküls), (f/f<sub>0</sub>)<sub>shape</sub> – *frictional ratio* mit der Annahme von 0,3 g H<sub>2</sub>O pro g Protein, a/b – Axial-Verhältnis, a – große Halbachse, b kleine Halbachse.

	r $\beta$ -MyHC <sub>664-915</sub> (wildtyp)	r $\beta$ -MyHC <sub>664-915</sub> IQ <sup>ala4</sup> (mutant Ala4)
<b>S<sub>20,w</sub></b>	3,86 ± 0,008 (S)	2,71 ± 0,018 (S)
<b>D<sub>20,w</sub></b>	6,81 ± 0,01 10 <sup>-7</sup> cm <sup>2</sup> /s	4,76 ± 0,03 10 <sup>-7</sup> cm <sup>2</sup> /s
<b><math>\tilde{v}</math></b>	0,746 ml/g	0,746 ml/g
<b>M</b>	56,66 kDa	56,23 kDa
<b>(f/f<sub>0</sub>)<sub>total</sub></b>	1,22	1,71
<b>(f/f<sub>0</sub>)<sub>shape</sub></b>	1,08	1,51
<b>axis ratio a/b</b>	~2,8	~ 9
<b>a (nm)</b>	~5,2	~11
<b>b (nm)</b>	~1,8	~1,2

Für die r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub> sowie r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup> Fusionsproteine wurde das errechnete Molekulargewicht von 57 kDa ermittelt. Die Bestimmung der f/f<sub>0</sub> erlaubte die Beurteilung der Konformation und Form des exprimierten Myosinbereiches von Aminosäure 664 – 915. Ein Verhältnis von 1 steht dabei für eher kugelförmige Partikel, während höhere Werte auf längere und gestrecktere Strukturen hindeuten. Das rekombinante Fusionsprotein r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub> zeigte eine kompakte Form mit einem Wert von (f/f<sub>0</sub>)<sub>shape</sub> = 1,08. Die Gesamtlänge lag bei 10,4 nm mit einem Durchmesser von ca. 3,6 nm (kalkuliert mit Hilfe des Axial-Verhältnis eines hydrodynamisch gleichwertig gestreckten Ellipsoids). Im Vergleich dazu wies das r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup> Protein, mit einem (f/f<sub>0</sub>)<sub>shape</sub> = 1,51, eine deutlich gestrecktere Form auf. Die Gesamtgröße wurde mit ca. 22 nm und einem Durchmesser von 2,4 nm bestimmt. Diese Daten legen nahe, dass die Alaninmutation der IQ2-

Bindungsdomäne eine Streckung der Struktur des Proteins, vielleicht ähnlich einer Bindung der RLC, zur Folge hat (Abb. 23).

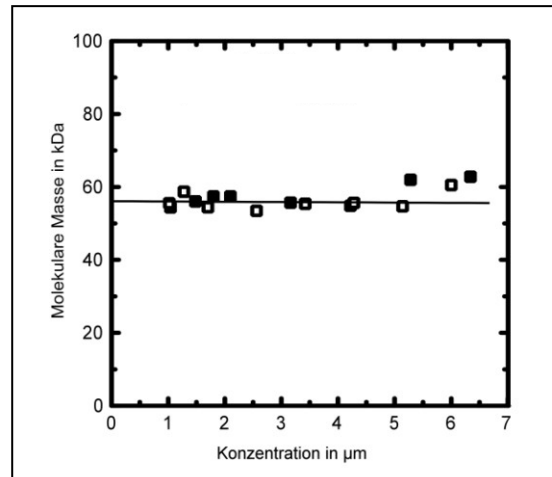


**Abb. 23: Schema des exprimierten Hebelarmbereiches basierend auf bekannten 3D-Strukturen modelliert nach den Daten der analytischen Ultrazentrifugation.** GST-Tag (PDB 2GST) in blau, Myosin-S1 (AS 664–843; PDB 2MYS) in grün und ein Teil des Myosin-S2 (rod)-Fragmentes (AS 849–920 PDB 2fxo) in rot. A) Schematische Darstellung von MyHC<sub>664-915</sub> modifiziert nach den Daten der analytischen Ultrazentrifugation. B) Darstellung des gestreckteren MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup> Fusionsproteins modelliert nach den Daten der analytischen Ultrazentrifugation (modifizierte nach Petzhold et al., 2010).

### 3.3 rβ-MyHC<sub>664-915</sub> und rβ-MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup> liegen in Lösung als Monomere vor

Zusätzlich konnte über Sedimentation-Gleichgewichts-Zentrifugation nachgewiesen werden, dass rβ-MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup> und rβ-MyHC<sub>664-915</sub> im Konzentrationsbereich von 0,5 – 6,5 μM in Lösungen als Monomer vorlagen. In Abbildung 24 ist die molekulare Masse der rekombinanten Proteine gegen die steigende Konzentration der in der Zentrifugation eingesetzten Proteinmenge dargestellt. In den im Versuch eingesetzten Konzentrationen war keine Dimerisierung oder Akkumulation des rβ-MyHC-Proteins zu beobachten. Die molekulare Masse der Fusionsproteine blieb stabil bei rund 57 kDa. Dies war besonders für den Einsatz des Proteins als Analyt in den Protein-Protein-Bindungsstudien von großer Bedeutung.

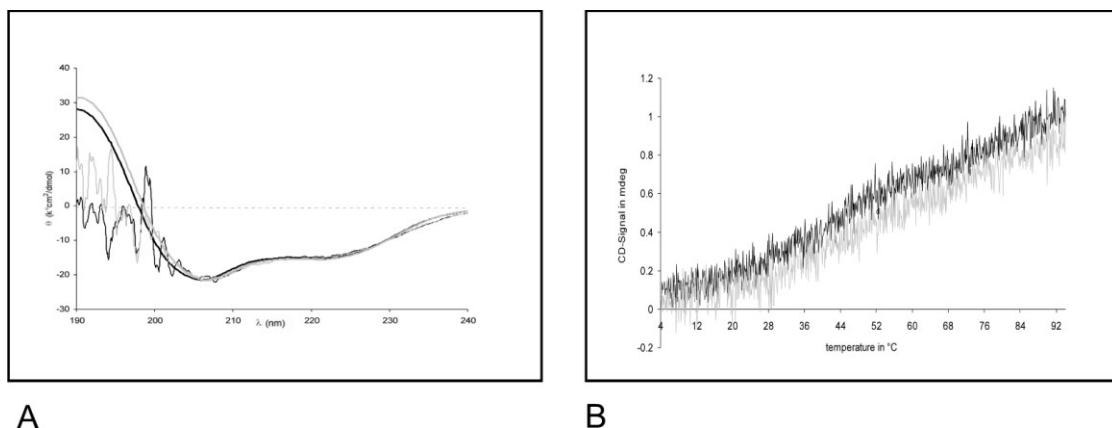




**Abb. 24: Sedimentations-Equilibrium-Zentrifugation von  $r\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub> und  $r\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup> (1.0–6.5  $\mu$ M).** Gefüllte Quadrate -  $r\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup>, weiße Quadrate -  $r\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub>. Die molekulare Masse der untersuchten Proteine liegt bei circa 57 kDa. Es ist keine Dimerisierung und damit der Anstieg der molekularen Masse auf 114 kDa im Bereich der eingesetzten Konzentration zu beobachten.

#### 3.4 CD-Spektrum und Schmelzkurve sind von der E56G Mutation nicht beeinflusst

CD-Spektren und Schmelzkurven der rekombinanten hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> Proteine wurden aufgezeichnet, um die sekundäre Struktur und Thermostabilität der Proben zu untersuchen. hVLC1 zeigte dabei im CD-Spektrum die für hauptsächlich  $\alpha$ -helikale Proteine typischen negativen Banden bei 222 nm und 208 nm zusammen mit einer positiven Bande bei 193 nm (Abb. 25A).



**Abb. 25: Sekundärstruktur- und Thermostabilitäts-Untersuchung von hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> mittels CD-Spektrum und Schmelzkurve.** A) Repräsentatives CD-Spektrum, hVLC1 – schwarz, hVLC1<sup>E56G</sup> – grau, gefüllte Kurve – glatt, Originalaufnahme – rauschige Kurve, jeweils 4  $\mu$ M B) Schmelzkurven wurde bei 218 nm aufgenommen während des Erhitzens der Proben von 4°C auf 94°C, hVLC1 – schwarz, hVLC1<sup>E56G</sup> – grau.

Tabelle 8 zeigt im Vergleich die über Brahms-Fit ermittelten Anteile der Sekundärstrukturen der CD-Spektren für hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup>. Der hohe  $\alpha$ -helikale Anteil von 54 % für hVLC1 stimmt mit der bekannten EF-Hand Struktur der leichten Myosinketten überein. Zusätzlich waren *random-coil*-Strukturen (41 %) und  $\beta$ -Faltblattstrukturen ( *$\beta$ -sheet*) (5 %) vertreten. Die Untersuchungen für hVLC1<sup>E56G</sup> wiesen keine signifikanten Änderungen, ausgelöst durch die eingefügte E56G Mutation, in der Sekundärstruktur des Proteins auf. Der Anteil der  $\alpha$ -helikalen Strukturen lag ebenfalls bei rund 50 %, gefolgt von *random-coil*- (41 %) und  $\beta$ -Faltblattstrukturen (9 %).

Die thermische Stabilität des rekombinanten hVLC1<sup>E56G</sup> Proteins zeigte in der Schmelzkurve keine signifikanten Unterschiede durch die Einführung der E56G Mutation im Vergleich zum hVLC1 Protein (Abb. 25B).

**Tab. 8: Aus dem CD-Spektrum errechneten prozentualen Anteile von  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und *random-coil*-Strukturen in den rekombinanten hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> Proteinen.**

	hVLC1	hVLC1 <sup>E56G</sup>
<i><math>\alpha</math>-helix</i>	54 %	50 %
<i><math>\beta</math>-sheet</i>	5 %	9 %
<i>random coil</i>	41 %	41 %

#### 3.5 Mutationen in der hVLC1 führen zu einer niedrigeren Affinität zwischen dem VLC/MyHC Komplex

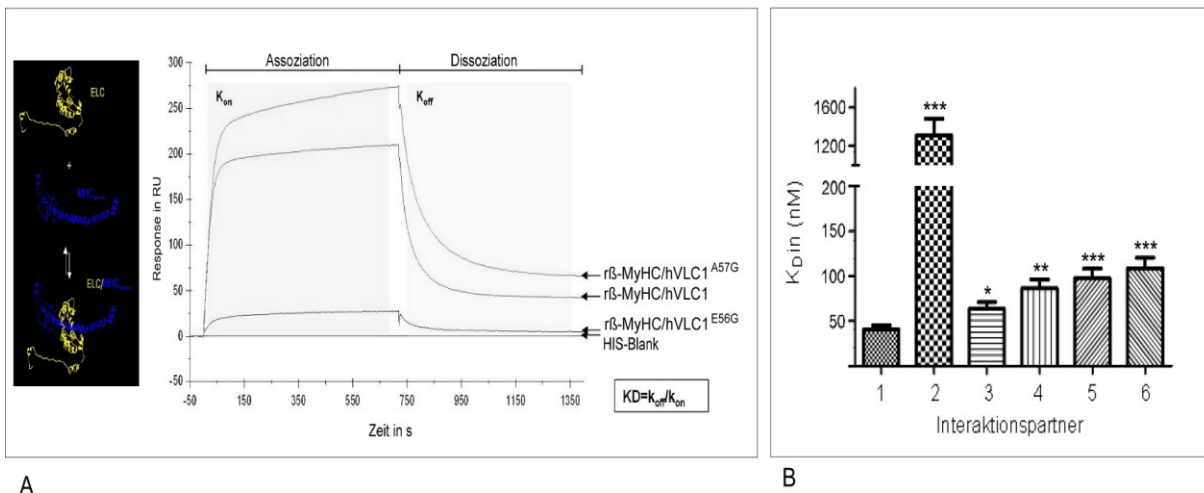
Um die Interaktion zwischen der leichten Myosinkette und ihrer IQ1 Bindungsstelle im Bereich des Hebelarms zu untersuchen, wurden Protein-Protein-Bindungsstudien mit Hilfe der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) durchgeführt. Dabei konnten Veränderungen im Bindungsverhalten, wie höhere oder niedrigere Affinitäten, von mutierten hVLC1 Formen zum Hebelarm der schweren Myosinkette detektiert werden. Über die Berechnung des  $K_D$ -Wertes aus Assoziation ( $k_{on}$ ) und Dissoziation ( $k_{off}$ ) war eine Aussage über die Stärke der Bindung zwischen den Proteinen möglich. Dabei stand ein hoher  $K_D$ -Wert für eine schwache Assoziation, während ein niedriger Wert eine starke Bindung bedeutete. Die hVLC1 bzw. die fünf mutierten hVLC1

### 3. Ergebnisse

Proteine wurden als Liganden auf den Chip gebunden und  $\text{r}\beta\text{-MyHC}_{664-915}\text{IQ2}^{\text{ala4}}$  in verschiedenen Konzentrationen (0,25 – 6,5  $\mu\text{M}$ ) als Analyt verwendet.

Abbildung 26A zeigt beispielhaft ein Originalsensogramm der SPR mit Assoziation und Dissoziation von  $\text{r}\beta\text{-MyHC}_{664-915}\text{IQ2}^{\text{ala4}}$  (1  $\mu\text{M}$ ) an die auf dem Chip gebundenen  $\text{hVLC1}$ ,  $\text{hVLC1}^{\text{E56G}}$  und  $\text{hVLC1}^{\text{A57G}}$  Proteine. Der HIS-blank ist in der Darstellung bereits subtrahiert. Die berechneten Werte für  $k_{\text{on}}$ ,  $k_{\text{off}}$  und  $K_{\text{D}}$  sind in Tabelle 9, der  $K_{\text{D}}$ -Wert zusätzlich nochmals in Abbildung 26B, dargestellt. Dabei zeigte sich eine starke Bindung zwischen der leichten Myosinkette ( $\text{hVLC1}$ ) und der IQ1 des Hebelarms ( $\text{r}\beta\text{-MyHC}_{664-915}\text{IQ2}^{\text{ala4}}$ ) ( $K_{\text{D}} = 41 \text{ nM}$ ). Im Vergleich dazu führten alle Mutationen im  $\text{hVLC1}$  Protein zu einer geringeren Affinität des Analyt-Liganden-Komplexes. Die Mutationen  $\text{A57G}$  ( $K_{\text{D}} = 64 \text{ nM}$ ),  $\text{E143K}$  ( $K_{\text{D}} = 86 \text{ nM}$ ),  $\text{M149V}$  ( $K_{\text{D}} = 98 \text{ nM}$ ) und  $\text{R154H}$  ( $K_{\text{D}} = 109 \text{ nM}$ ) wiesen signifikant höhere  $K_{\text{D}}$ -Werte und damit eine reduzierte Bindungsstärke auf.

Im Besonderen traf dies auf den  $\text{hVLC1}^{\text{E56G}}/\text{r}\beta\text{-MyHC}_{664-915}\text{IQ2}^{\text{ala4}}$ -Komplex zu, welcher mit  $K_{\text{D}} = 1310 \text{ nM}$  die schwächste Bindung zwischen leichter Myosinkette und Hebelarm hervorrief. Aufgrund der größten Unterschiede des  $\text{hVLC1}^{\text{E56G}}/\text{r}\beta\text{-MyHC}_{664-915}\text{IQ2}^{\text{ala4}}$ -Komplexes, im Vergleich zur nativen leichten Myosinkette, wurde im Rahmen der Arbeit die  $\text{E56G}$  Mutation für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.



**Abb. 26: Exemplarisches Oberflächen-Plasmon-Resonanz Sensorgramm und  $K_{\text{D}}$ -Werte.** A) Originalregistrierung einer Protein-Protein-Interaktion mit  $\text{hVLC1}$ ,  $\text{hVLC1}^{\text{E56G}}$ ,  $\text{hVLC1}^{\text{A57G}}$  und HIS-blank als Ligand und  $\text{r}\beta\text{-MyHC}_{664-915}\text{IQ2}^{\text{ala4}}$  als Analyt (1  $\mu\text{M}$ ). B) Über Assoziation und Dissoziation ermittelter  $K_{\text{D}}$ -Werte der Komplexe von: 1 -  $\text{hVLC1}/\text{r}\beta\text{-MyHC}_{664-915}\text{IQ2}^{\text{ala4}}$ , 2 -  $\text{hVLC1}^{\text{E56G}}/\text{r}\beta\text{-MyHC}_{664-915}\text{IQ2}^{\text{ala4}}$ , 3 -  $\text{hVLC1}^{\text{A57G}}/\text{r}\beta\text{-MyHC}_{664-915}\text{IQ2}^{\text{ala4}}$ , 4 -  $\text{hVLC1}^{\text{E143K}}/\text{r}\beta\text{-MyHC}_{664-915}\text{IQ2}^{\text{ala4}}$ , 5 -  $\text{hVLC1}^{\text{M149V}}/\text{r}\beta\text{-MyHC}_{664-915}\text{IQ2}^{\text{ala4}}$ , 6 -  $\text{hVLC1}^{\text{R154H}}/\text{r}\beta\text{-MyHC}_{664-915}\text{IQ2}^{\text{ala4}}$ , MW  $\pm$  SEM,  $n \geq 8$ ,  $p^* < 0.05$ ,  $p^{**} < 0.01$ ,  $p^{***} < 0.005$ .

### 3. Ergebnisse

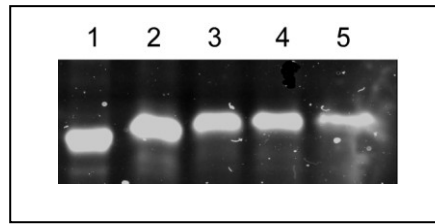
**Tab. 9: Oberflächen-Plasmon-Resonanz Ergebnisse  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  und  $K_D$  der verschiedenen hVLC/MyHC-Komplexe.** Die kinetischen Konstanten  $k_{on}$  (1/Ms) und  $k_{off}$  (1/s) sowie der  $K_D$ -Wert der Interaktionspartner hVLC1 normale/mutierte Form mit MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup> sind als Mittelwerte mit SEM angegeben.  $k_{on}$  misst die Geschwindigkeit der Assoziation der Bindung von Ligand und Analyt,  $k_{off}$  steht für die Geschwindigkeit der Dissoziation des Analyten vom Komplex,  $K_D$  = Dissoziationskonstante,  $n \geq 8$ ,  $p^* < 0.05$ ,  $p^{**} < 0.01$ ,  $p^{***} < 0.005$ .

	Interaktionspartner	$k_{on}$ (1/Ms)	$k_{off}$ (1/s)	$K_D$ (nM)
1	hVLC1/MyHC <sub>664-915</sub> IQ2 <sup>ala4</sup>	$5,38 \cdot 10^3 \pm 0,6 \cdot 10^3$	$2,0 \cdot 10^{-4} \pm 2,9 \cdot 10^{-5}$	$41,0 \pm 4,2$
2	hVLC1 <sup>E56G</sup> /MyHC <sub>664-915</sub> IQ2 <sup>ala4</sup>	$2,23 \cdot 10^3 \pm 0,3 \cdot 10^3$	$2,91 \cdot 10^{-3} \pm 5,6 \cdot 10^{-4}$	$1310,0 \pm 170^{***}$
3	hVLC1 <sup>A57G</sup> /MyHC <sub>664-915</sub> IQ2 <sup>ala4</sup>	$4,79 \cdot 10^3 \pm 0,7 \cdot 10^3$	$2,83 \cdot 10^{-4} \pm 3,7 \cdot 10^{-5}$	$63,5 \pm 7,3^*$
4	hVLC1 <sup>E143K</sup> /MyHC <sub>664-915</sub> IQ2 <sup>ala4</sup>	$2,35 \cdot 10^4 \pm 2,5 \cdot 10^3$	$1,83 \cdot 10^{-3} \pm 8,4 \cdot 10^{-5}$	$86,2 \pm 10,1^{**}$
5	hVLC1 <sup>M149V</sup> /MyHC <sub>664-915</sub> IQ2 <sup>ala4</sup>	$1,76 \cdot 10^4 \pm 1,5 \cdot 10^3$	$1,59 \cdot 10^{-3} \pm 7,5 \cdot 10^{-5}$	$97,5 \pm 10,7^{***}$
6	hVLC1 <sup>R154H</sup> /MyHC <sub>664-915</sub> IQ2 <sup>ala4</sup>	$1,83 \cdot 10^4 \pm 2,8 \cdot 10^3$	$1,99 \cdot 10^{-3} \pm 1,9 \cdot 10^{-4}$	$109,0 \pm 11,6^{***}$

#### 3.6 hVLC1<sup>E56G</sup> erhöht die Fluoreszenzlebensdauer in permeabilisierten Soleus und Psoasmuskelfasern

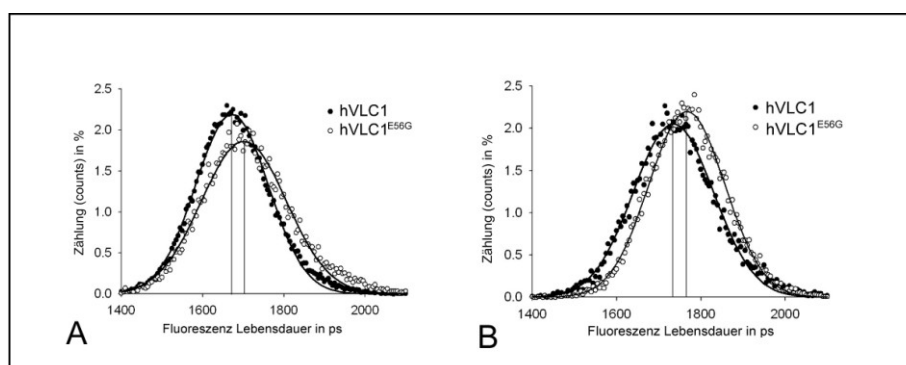
Zur Analyse der Fluoreszenzlebensdauer wurden die Cys-Aminosäuren Cys-67 und Cys-182 der hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> Proteine mit 7-diethylamino-3-(((2-iodoacetamido) ethyl) amino) carbonyl)-Coumarin markiert und die endogenen leichten Myosinketten im permeabilisierten Soleus- bzw. Psoasmuskel gegen die markierten Proteine substituiert. Die Effizienz des Austausches wurde über eine Analyse der Muskelfaserzusammensetzung mit Hilfe eines 8 %igen SDS Gels untersucht. Die Substitution konnte über den Vergleich der Coumarin-Fluoreszenz von rekombinanten hVLC1 als Standard gegen die Fluoreszenz der Muskelfasern mit hVLC1 bzw. hVLC1<sup>E56G</sup> abgeschätzt werden (Abb. 27). Die Berechnung ergab Werte von  $58 \pm 7$  % für die Substitution von hVLC1 bzw.  $76 \pm 11$  % für hVLC1<sup>E56G</sup>. Dies war nur als Nachweis für einen erfolgreichen Austausch der endogenen durch die markierten leichten Myosinketten notwendig, da die Fluoreszenzlebensdauer und -messung unabhängig von dem prozentualen Anteil der Substitution in den Fasern war.

### 3. Ergebnisse



**Abb. 27: Coumarin Fluoreszenz Analyse eines 8 %iges SDS-Gel von einem Muskelfaserextrakt.** hVLC1 (Bande 2, 4) und hVLC1<sup>E56G</sup> (Bande 3, 5) substituiert in M. psoas (Bande 2, 3) bzw. M. soleus (4, 5), Fluoreszenz der Coumarin-markierte hVLC1 Probe (Bande 1) wurde als Standard genutzt.

Um strukturelle Unterschiede zwischen beiden Proteinen zu beurteilen, wurden Muskelfasern von M. Psoas und M. Soleus mit substituierten leichten Ketten in Relax-Lösung auf die Fluoreszenzlebensdauer der Coumarin markierten Cys-Aminosäuren untersucht. Der Fluoreszenzabbau in jedem Pixel eines Bildes wurde gefittet (Exponentialfunktion) und ergab eine Gaußsche Normalverteilung der Fluoreszenzlebensdauer in den A-Banden. Die Auswertung der durchschnittlichen Fluoreszenzlebensdauer zeigte eine signifikant verlängerte Lebensdauer der Fluoreszenz in den hVLC1<sup>E56G</sup> substituierten Muskeln im Vergleich zu Fasern mit hVLC1. Der Anstieg der Fluoreszenzlebensdauer für hVLC1<sup>E56G</sup> konnte sowohl in Soleus- als auch in Psoasmuskelfasern beobachtet werden. So zeigte das Fluoreszenzlebensdauer-Profil von hVLC1<sup>E56G</sup> eine signifikante Verschiebung nach rechts, in Richtung höherer Fluoreszenzlebensdauer, im Vergleich zur hVLC1 (Abb. 28).

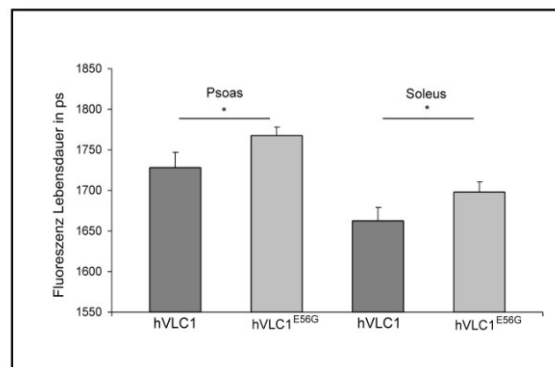


**Abb. 28: Fluoreszenzlebensdauer-Profil von hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup>.** FLIM Aufnahmen der A-Bande von erschlafte Muskelfasern (Relax). A – M. Psoas, B – M. Soleus, graue Linie – Gaußsche Normalverteilung (Fit) der Fluoreszenzzeitverteilung.

Abbildung 29 zeigt die Auswertung der Fluoreszenzdauer-Profile von hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> in Psoas- bzw. Soleusmuskelfasern. Während hVLC1 im Psoasmuskel eine Fluoreszenzlebensdauer von  $1728 \pm 19$  ps erreichte, zeigten Fasern mit

hVLC1<sup>E56G</sup> substituiertem Protein eine signifikante Verlängerung der Lebensdauer auf  $1768 \pm 10$  ps. Dieser Anstieg konnte ebenfalls im Soleusmuskel beobachtet werden (hVLC1  $1662 \pm 17$  ps zu hVLC1<sup>E56G</sup>  $1698 \pm 12$  ps).

Obwohl im CD-Spektrum keine strukturellen Unterschiede im hVLC1<sup>E56G</sup>-Protein nachgewiesen werden konnten, deuten die veränderten Fluoreszenzzeiten auf eine Modifikation in der Proteinstruktur der leichten Ketten hin.



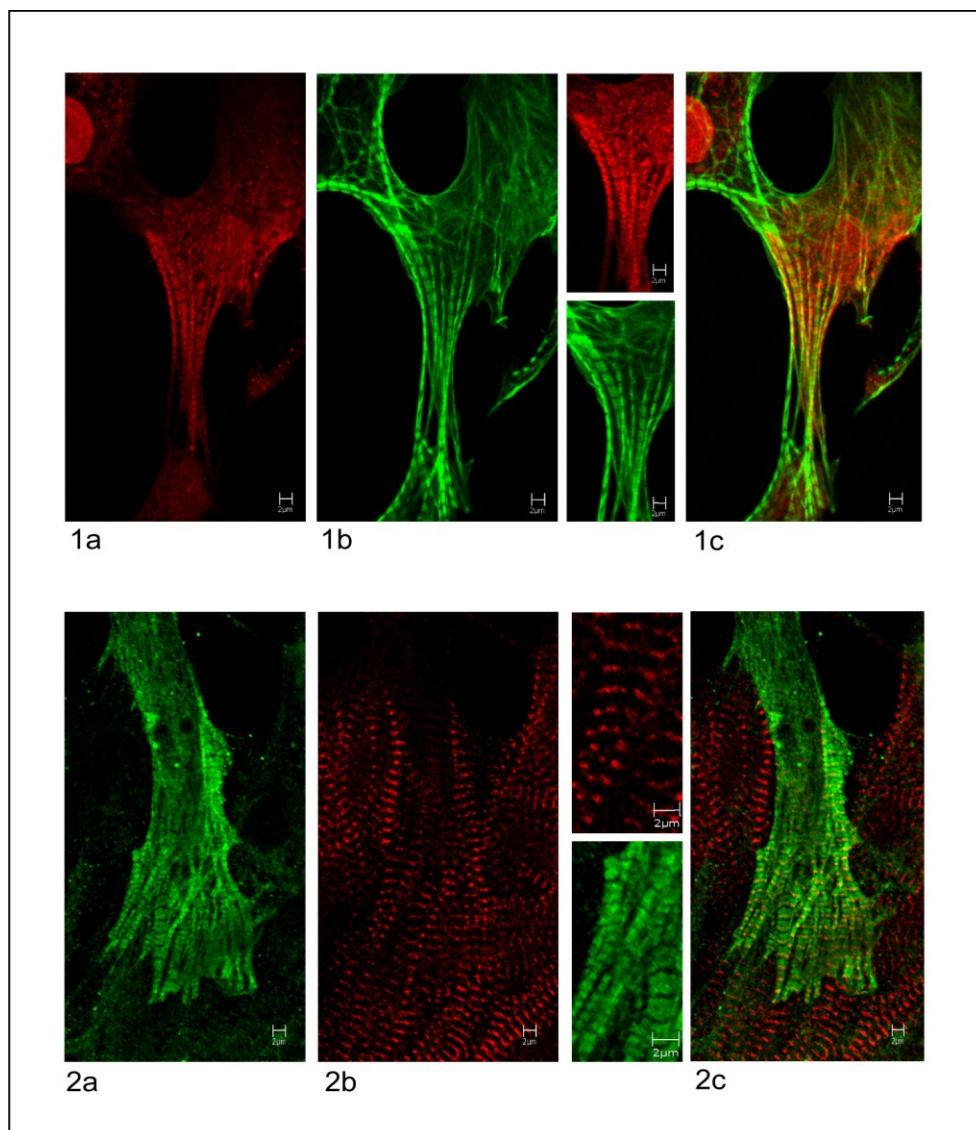
**Abb. 29: Fluoreszenzlebensdauer von hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> in M. Psoas oder M. Soleus (Relaxlösung).** hVLC1<sup>E56G</sup> zeigt eine signifikante Verlängerung der mittleren Fluoreszenzlebensdauer ( $p^* < 0.05$ ), jeweils 3 Muskelfasern substituiert und mehrfach gemessen, MW  $\pm$  SE.

Die FLIM Versuche wurden in Kooperation mit D. Ushakov, Imperial College, London, UK durchgeführt.

#### 3.7 hVLC1 wird im kompetitiven Sorting Assay bevorzugt in das Sarkomer eingebaut

Neonatale Rattenkardiomyozyten wurden mit gleichen Mengen hVLC1 bzw. hVLC1<sup>E56G</sup> cDNA kotransfiziert. Zusätzlich wurden Zellen in Einzeltransfektionen mit nur einer der beiden cDNA Varianten transfiziert. Des Weiteren wurden zu allen Versuchen nichttransfizierte Kardiomyozyten als Kontrollen parallel kultiviert. Der Einbau in das Sarkomer wurde mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie detektiert. Dabei wurden Antikörper gegen den jeweiligen Protein-Tag, myc-hVLC1 bzw. HIS-hVLC1<sup>E56G</sup>, verwendet. Die optimierte Transfektionszeit von 18 h wurde von Petzhöld et al. 2011 übernommen.

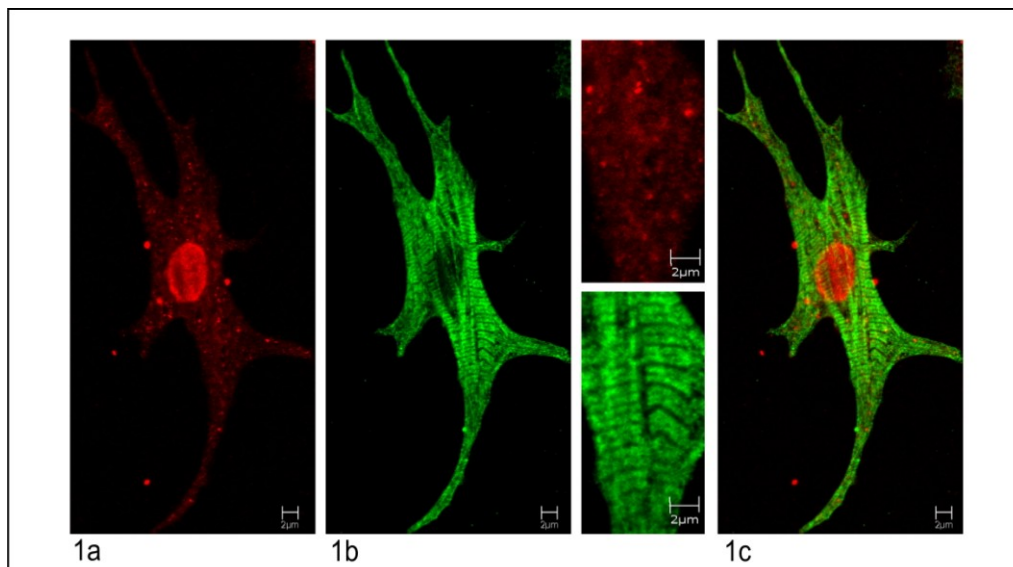
Über Einzeltransfektionsversuche konnte nachgewiesen werden, dass sowohl hVLC1 als auch hVLC1<sup>E56G</sup> in den Zellen exprimiert und in das Sarkomer eingebaut wurden. Jedoch ist bereits hierbei ein besserer Einbau von hVLC1 zu beobachten. In Abbildung 30/1a ist der Einbau von hVLC1<sup>E56G</sup> während einer Einzeltransfektion in die neonatale Kardiomyozyte mittels eines anti-myc-Antikörpers dargestellt. Zusätzlich erfolgte zur Lokalisation eine Färbung von F-Aktin (Abb. 30/1b) und eine Überlagerung (*merge*) der Bilder (Abb. 30/1c). Der Nachweis des hVLC1 Proteins im Einzeltransfektionsversuch wurde über den myc-Tag sowie die Gegenfärbung mit anti-Myomesin-Antikörpern erbracht und ist in Abbildung 30/2a bzw. 30/2b zu sehen.



**Abb. 30: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie - Einbau der essentiellen leichten Myosinketten hVLC1 bzw. hVLC1<sup>E56G</sup> in neonatale Rattenkardiomyozyten 18 h nach Einzeltransfektion mit Lipofectamin.** 1a) Einzeltransfektion mit hVLC1<sup>E56G</sup> cDNA (anti-HIS-Antikörper, rot), 1b) Gegenfärbung mit F-Aktin (grün) zur Lokalisation, 1c) merge von 1a/1b. 2a) Einzeltransfektion mit hVLC1 cDNA (anti-myc-Antikörper, grün), 2b) Gegenfärbung mit Myomesin (rot) zur Lokalisation, 2c) merge von 2a/2b.

Nicht transfizierte Zellen zeigten keine unspezifische Bindungen bzw. Fluoreszenz der Antikörper im Bereich der Sarkomere. Eine bereits bekannte unspezifische Bindung des HIS-Antikörpers am Zellkern wurde erneut beobachtet.

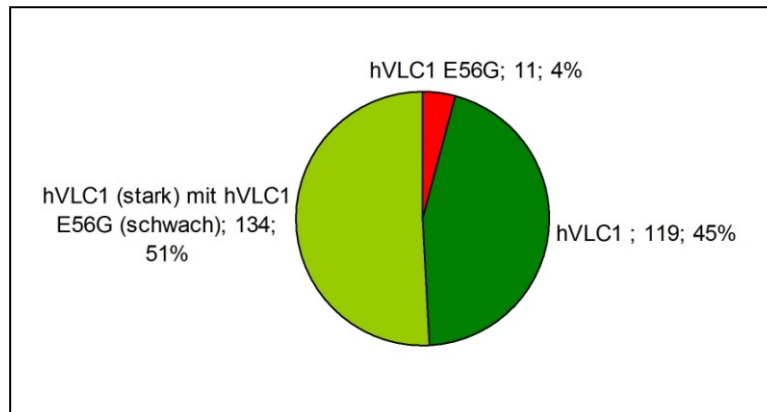
264 kotransfizierte Kardiomyozyten aus mehreren Versuchen wurden dokumentiert und ausgewertet. Dabei zeigt sich ein deutlicher Unterschied im Einbauverhalten von hVLC1 im Vergleich zu hVLC1<sup>E56G</sup>. Bei den 264 ausgewerteten kotransfizierten Kardiomyozyten zeigen 119 Zellen (45 %) den Einbau von hVLC1 in das Sarkomer, bei 134 Zellen (51 %) war ein deutlicher Einbau von hVLC1 zu beobachten, verbunden mit einem zusätzlichen schwachen Einbau von hVLC1<sup>E56G</sup>. Nur 11 Zellen (4 %) ließen ausschließlich einen Einbau von hVLC1<sup>E56G</sup> 18 h nach Transfektion erkennen. Während hVLC1 sich in rund 95 % der transfizierten Zellen in das Sarkomer integriert hatte, lag hVLC1<sup>E56G</sup> meist nur diffus verteilt in der Zelle vor. Nur in 4 % der untersuchten Kardiomyozyten konnte ein favorisierter Einbau von hVLC1<sup>E56G</sup> dokumentiert werden. Abbildung 31 zeigt exemplarisch eine kotransfizierte neonatale Kardiomyozyte nach 18 h Transfektionszeit. Die diffuse zytoplasmatische Verteilung von hVLC1<sup>E56G</sup> (31/1a), die Integration von hVLC1 ins Sarkomer (31/1b) und eine Fusion beider Bilder (31/1c) sind dargestellt.



**Abb. 31: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie – Koexpression der leichten Myosinketten hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> in neonatale Rattenkardiomyozyten 18 h nach Transfektion mit Lipofectamin.** 1a) hVLC1<sup>E56G</sup> (HIS-Tag, rot) detektiert über den HIS-Tag Antikörper, diffuse zytoplasmatische Verteilung ohne Sarkomerintegration, 1b) hVLC1 (myc-Tag, grün) detektiert über den myc-Tag Antikörper, bevorzugte Inkorporation in die Sarkomerstruktur, 1c) merge beider Bilder (1a/1b).



Innerhalb der kotransfizierten Zellen war, wie aufgrund der im SPR festgestellten Affinitätsverringerng des hVLC1<sup>E56G</sup>/MyHC-Komplexes zu vermuten, hVLC1 im Vergleich zu hVLC1<sup>E56G</sup> im Einbau in das Sarkomer nach 18 Stunden Transfektionszeit deutlich bevorzugt (Abb. 32).



**Abb. 32: Verteilung von hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> in den 264 kotransfizierten neonatalen Rattenkardiomyozyten.** Bei 264 ausgewerteten kotransfizierten Kardiomyozyten zeigen 119 Zellen (45 %) den Einbau von hVLC1 in Sarkomer, bei 134 Zellen (51 %) war ein deutlicher Einbau von hVLC1 zu beobachten mit einem zusätzlichen schwachen Einbau von hVLC1<sup>E56G</sup> und nur 11 Zellen (4 %) ließen einen bevorzugten Einbau von hVLC1<sup>E56G</sup> erkennen.

#### 3.8 Analyse der transgenen Mauslinien TGM/hVLC1 und TGM/hVLC1<sup>E56G</sup>

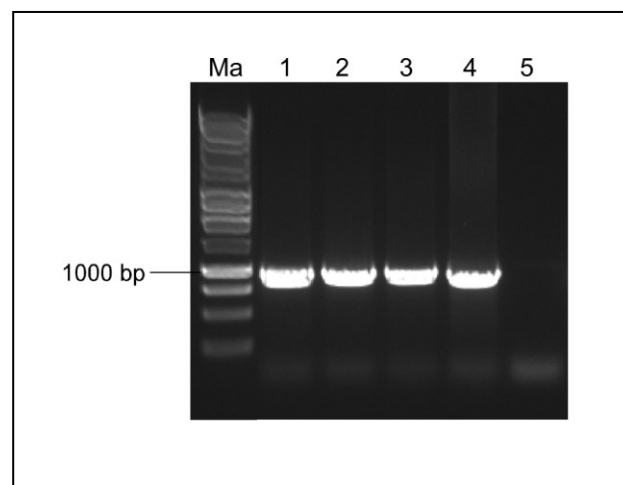
Im Rahmen der Arbeit wurde erstmals ein transgenes Mausmodell für die E56G Mutation der humanen leichten essentiellen ventrikulären Myosinkette generiert und charakterisiert. Wie unter 2.8 beschrieben, wurde ein Konstrukt mit herzspezifischem  $\alpha$ -MyHC-Promoter der Maus und hVLC1 oder hVLC1<sup>E56G</sup> cDNA erstellt und über pronukleäre Mikroinjektion in befruchtete Eizellen von BL6/C57-Tieren eingebracht. Pro Konstrukt (hVLC1<sup>E56G</sup> und als entsprechende Kontrolle hVLC1) sollten zwei Tierlinien generiert werden. Es wurden ausschließlich männliche Tiere für die Versuche verwendet, um Veränderungen aufgrund hormoneller Schwankungen durch den Zyklus der weiblichen Tiere auszuschließen.

Die TGM-Linie der nativen humanen essentiellen leichten Myosinkette wurde nach dem Foundertier als Linie L7385 bzw. TGM/hVLC1 betitelt. In Rahmen der Arbeit war es nur möglich eine Linie zu erstellen, da sich in den Myofibrillen der zweiten Foundertierlinie, trotz positiver Genotypisierung, keine mRNA bzw. Protein nachweisen ließ und diese Linie daraufhin aus der Studie ausgeschlossen wurde.

Nach dem gleichen Prinzip erfolgte die Bezeichnung der TGM-Linien für die E56G mutierte hVLC1 als L3552 beziehungsweise L3566. Aufgrund gleicher Verhältnisse im Substitutionslevel von muriner gegen humane VLC1 (keine sign. Unterschiede zw. den Linien) in beiden Linien, wurden sie im Folgenden zusammengefasst ausgewertet (gepoolt) und als TGM/hVLC1<sup>E56G</sup> bezeichnet.

#### 3.8.1 Das hVLC1 bzw. hVLC1<sup>E56G</sup> Konstrukt lässt sich über Genotypisierung in den transgenen Tieren nachweisen

Die Genotypisierung der verschiedenen Mauslinien erfolgte über die Gewinnung von genomischer DNA aus Gewebe von Ohrmarkierungen. Über eine transgenspezifische PCR mit den Primern Nr. 15 und 16 (siehe Tab. 1) konnte das jeweilige Konstrukt im Tier nachgewiesen werden. Dabei lag ein Primer im alpha-MyHC-Promoter der Maus, der andere im Bereich der humanen leichten Kette. Abbildung 33 zeigt Genotypisierungen von Mäusen aus jeweils einer der drei erstellten Linien. Zusätzlich wurden bei jeder PCR immer eine Positivkontrolle (mit Konstrukt-DNA) und eine Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O statt DNA) mitgeführt. Bei positiven Tieren konnte im Agarosegel eine Bande bei circa 1000 bp nachgewiesen werden. Dabei traten keine unspezifischen PCR-Produkte auf. Tiere ohne transgenes Konstrukt wiesen keine Banden im Agarosegel auf. Somit konnte für jedes einzelne Tier der transgene Status eindeutig bestimmt werden.

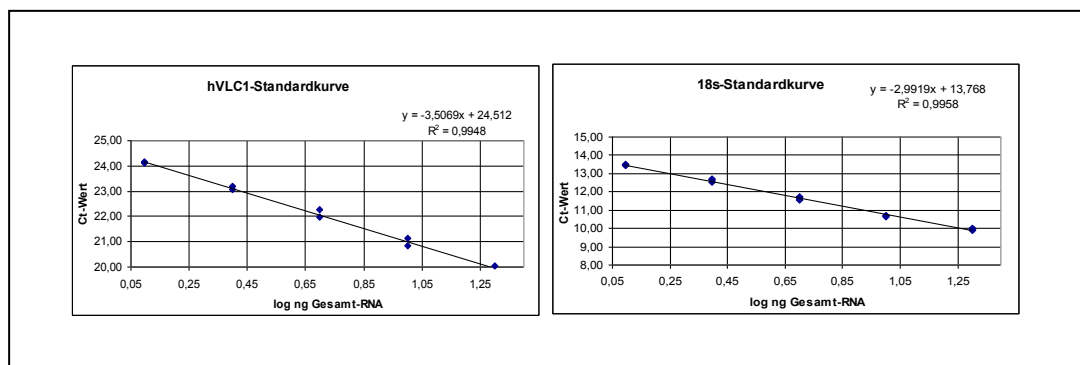


**Abb. 33: Genotypisierung der transgenen Mauslinien 0,8 %iges Agarosegel.** Aufgetragen sind transgenspezifische PCR-Produkte von Tieren der Linien L3552 (Bahn 1), L3566 (Bahn 2), L7385 (Bahn 3), Positivkontrolle (Bahn 4) und Negativkontrolle (Bahn 5), Ma – Perfect Plus 1kb Ladder.

### 3.8.2 In den transgenen Mauslinien lassen sich hohe mRNA Level für hVLC1 bzw. hVLC1<sup>E56G</sup> mittels qRT-PCR nachweisen

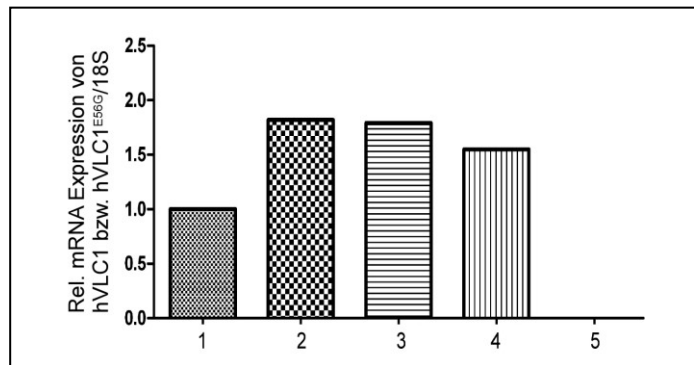
Zur weiteren Analyse wurde, wie unter 2.8.2 beschrieben, eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt, um als nächsten Schritt eine Aussage über die Existenz von hVLC1 bzw. hVLC1<sup>E56G</sup> mRNA in den Tierlinien treffen zu können. Die Auswertung erfolgte über die relative Quantifizierung mit Hilfe von Eichreihen und der Normierung auf einen internen Standard (*housekeeper*-Gen), welcher in diesem Fall die 18S-rRNA war.

Die Eichreihen sind in Abbildung 34 für hVLC1 (links) und 18S (rechts) dargestellt. Über den mittels qRT-PCR bestimmten C<sub>t</sub>-Wert der Proben konnte die AusgangsmRNA Menge bestimmt werden. Anschließend erfolgte die Normierung auf den *housekeeper* 18S.



**Abb. 34: Standardkurven von hVLC1 und 18S-rRNA über die anschließend mittels des C<sub>t</sub>-Wertes die mRNA Level bestimmt wurden.**

In Abbildung 35 ist die Normierung der einzelnen transgenen Mauslinien auf den Standard 18S-rRNA dargestellt. Dabei zeigten alle Linien vergleichbare transgene mRNA Level, welche noch über dem hohen mRNA Level des 18S Standards lagen. Die normierten Werte der mRNA Level für hVLC1 bzw. hVLC1<sup>E56G</sup>, bezogen auf den Standard (Standard = 1), lagen für die Linie 7385 bei 1,82, für die Linie 3566 bei 1,79 und für Linie 3552 bei 1,55. In dem mitgeführten Kontrolltier, einer C57/BL6 Maus, konnte erwartungsgemäß kein hVLC1 auf mRNA Ebene nachgewiesen werden.



**Abb. 35:** Semiquantitative Analyse mittels qRT-PCR der mRNA Expression von hVLC1, hVLC1<sup>E56G</sup> und 18S-rRNA im Herzen der transgenen Mäuse normiert auf den Standard 18S. 1 - Standard 18S (1), 2 - Linie 7385 (1,82), 3 - Linie 3566 (1,79), 4 - Linie 3552 (1,55), 5 - Kontrolltier C57/BL6 (0,0).

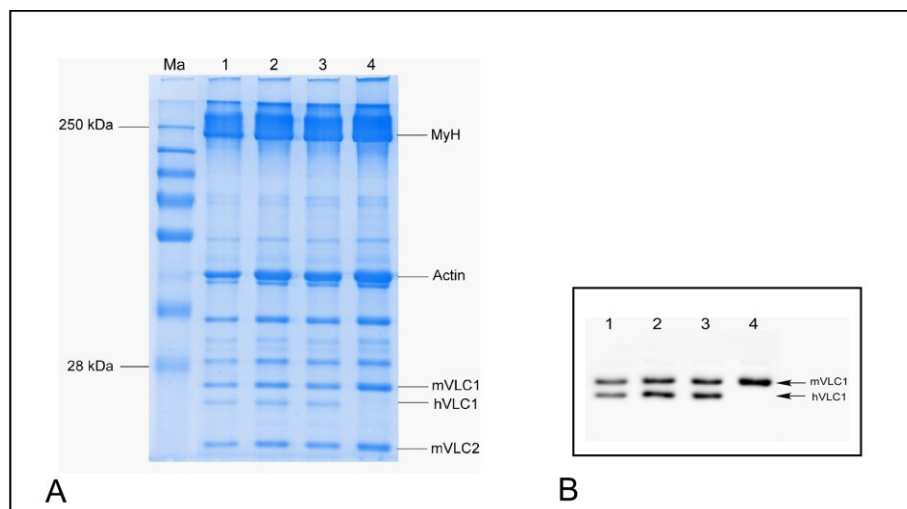
#### 3.8.3 Murine VLC1 wird in den Myofibrillen der transgenen Tiere durch humane VLC1 bzw. VLC1<sup>E56G</sup> substituiert

Die humane leichte Myosinkette unterscheidet sich in der Anzahl der Aminosäuren von der endogenen leichten Kette der Maus. Während die humane VLC1 195 Aminosäuren umfasst, besitzt die murine leichte Myosinkette eine Größe von 204 Aminosäuren. Die Differenz von 9 Aminosäuren, und die damit verbundene unterschiedliche molekulare Masse der Proteine, ermöglichte die Unterscheidung von muriner und humaner leichter Myosinkette im 12%igen SDS-Gel über das Laufverhalten (Abb. 36).

Über den Nachweis der humanen leichten Kette, zusätzlich zu den endogenen murinen VLCs in purifizierten Myofibrillen aus Herzgewebe, konnte somit der Einbau von hVLC1 bzw. hVLC1<sup>E56G</sup> in das Sarkomer bestätigt werden. Außerdem erfolgte die Berechnung der Proteinsubstitution in den einzelnen TGM-Linien. Humanes VLC1 Protein, welches nur im Zytoplasma der Muskelfasern vorlag, wurde durch die verschiedenen Waschschriffe der Myofibrillenpräparation entfernt. Zusätzlich zum SDS-Gel wurden im Westernblot humane und murine ELCs mittels Antikörper nachgewiesen. Aufgrund der großen Homologie zwischen hVLC1 und mVLC1 war es nicht möglich, einen Antikörper zu erstellen, welcher ausschließlich die humane leichte Kette detektierte. Der hier verwendete hVLC1 Antikörper (gegen die N-terminale-Peptidsequenz Mca-Gly\_PKKPEPKDDAKA, entspricht AS 3-15 in hVLC1) erkannte jeweils auch das endogene mVLC1. In Westernblotanalysen

### 3. Ergebnisse

konnte bestätigt werden, dass es sich bei den im SDS-Gel identifizierten hVLC1 bzw. mVLC1 tatsächlich um die leichten Myosinketten handelte. Abbildung 36A zeigt ein mit Coomassie angefärbtes 12 %iges SDS Gel. Aufgetragen sind Myofibrillenpräparationen der einzelnen TGM-Linien (1-3) und ein C57/BL6 Kontrolltier (4). Im Bereich von 26 kDa ist bei allen Tieren die murine VLC1 sichtbar. Nur in den transgenen Mäusen ist zusätzlich die 9 AS kleinere humane VLC1 vorhanden. Des Weiteren ist in Abbildung 36B der zugehörige Westernblot dargestellt.



**Abb. 36: Expression und Substitution von hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> in transgenen Tierlinien- und C57/BL6 Kontrolltier.** 1A) 12 %iges SDS-Gel (Coomassie) von aufgereinigten Myofibrillen (15 µg pro Bahn) aus Herzmuskelgewebe, aufgrund des Größenunterschiedes zwischen hVLC1/hVLC1<sup>E56G</sup> und dem endogenen mVLC1 sind beide Proteine am Laufverhalten im Gel zu unterscheiden, Bahn 1 – L7385 (35 ± 0,8 %, N = 15), Bahn 2 – L3552 (35,7 ± 2,2 %, N = 10), Bahn 3 – L3566 (41,6 ± 3,3 %, N = 20), Bahn 4 – C57/BL6 Kontrolltier, Ma – Precision Plus Protein Standards Dual Color 1B) Westernblot von Myofibrillenpräparation mit VLC1 Antikörper, Bahn 1 – L7385, Bahn 2 – L3552, Bahn 3 – L3566, Bahn 4 – C57/BL6 Kontrolltier.

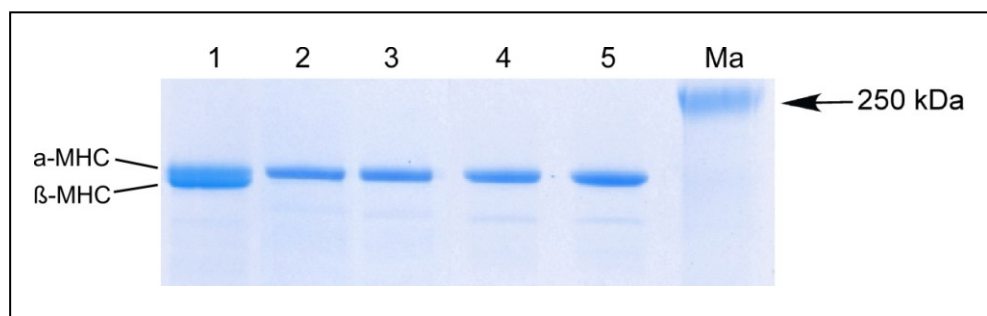
Über die Software ImageJ wurde eine Aussage über die prozentuale Verteilung von hVLC1 bzw. hVLC1<sup>E56G</sup> im Verhältnis zur endogenen mVLC1 getroffen. Dabei kam die Linie L7385 (hVLC1) auf eine Substitution von 35,6 ± 0,8 % (N = 15) der endogenen mVLC. Die Linien L3566 (hVLC1<sup>E56G</sup>) und L3552 (hVLC1<sup>E56G</sup>) lagen bei 41,6 ± 3,3 % (N = 20) bzw. 35,7 ± 2,2 % (N = 10) Transgensubstitution. Statistische Untersuchungen zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Linien L3566 und L3552, sodass im weiteren Verlauf der Untersuchungen (Echokardiographie, Langendorff, Zell-Verkürzungsmessungen) beide

TGM/hVLC1<sup>E56G</sup>-Linien zusammengefasst betrachtet und die Werte gepoolt wurden ( $38,7 \pm 2,2 \%$ ,  $N = 30$ ).

Wie bereits bei den mRNA Leveln beobachtet, zeigten alle drei transgenen Linien auch auf Substitutionsebene der Proteine ähnliche Werte auf. Daher ließen sich die Resultate der folgenden Untersuchungen der transgenen Mauslinien TGM/hVLC1 und TGM/hVLC1<sup>E56G</sup> problemlos miteinander vergleichen.

#### 3.8.4 Alpha- und beta-Myosinverteilung sind in transgenen Tieren nicht verändert

Bei hypertrophen Veränderungen im Herzen von Mäusen kommt es zum Shift in der Expressionsverteilung zwischen alpha- und beta-schwerer Myosinkette ( $\alpha$ -MyHC,  $\beta$ -MyHC). Die Expression der  $\alpha$ -MyHC im Ventrikel wird, zugunsten der  $\beta$ -MyHC, herunterreguliert. Da die Isoformen Unterschiede in bestimmten funktionellen Eigenschaften aufweisen, sollte kontrolliert werden, ob die Herzen der transgenen Tiere im Alter von drei Monaten schon von einem solchen Shift betroffen waren. Abbildung 37 zeigt im 5 %igen SDS-Gel aufgetrennte purifizierte Myofibrillen im Bereich von 250 kDa. Die Tiere der Linien L7385, L3552 und 3566 (Bahn 3, 4, 5) zeigen im Vergleich zu einem C57/BL6 Kontrolltier (Bahn 2) keine Veränderung in ihrer  $\alpha$ - /  $\beta$ -MyHC Verteilung. Auf Bahn 1 ist die Myofibrillenpräparation eines dilatierten Rattenherzens aufgetragen.



**Abb. 37: Alpha- und beta-Myosinverteilung im Herzen der TGM-Linien.** Auftrennung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -MyHC in einem 5 %iges SDS-Gel (Coomassie), 1 – dilatiertes Herz (Ratte), 2 – C57/BL6 Kontrollmaus, 3 – L7385, 4 – L3552, 5 – L3566, Ma – Precision Plus Protein Standards Dual Color.

### 3.8.5 Transgene hVLC1<sup>E56G</sup> Tiere zeigen eine beginnende Hypertrophie im Echo

Die Ergebnisse der echokardiologischen Untersuchungen von männlichen, drei Monate alten transgenen hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> Wurfgeschwistern sind in Tabelle 10 dargestellt. Eine beginnende Hypertrophie ist dabei mit einer Verdickung des interventrikulären Septums (IVS) und der hinteren linken Ventrikelwand (LVPW) zu beobachten. Zusätzlich könnten dadurch obstruktive Störungen beim Auswurf des Blutes entstehen.

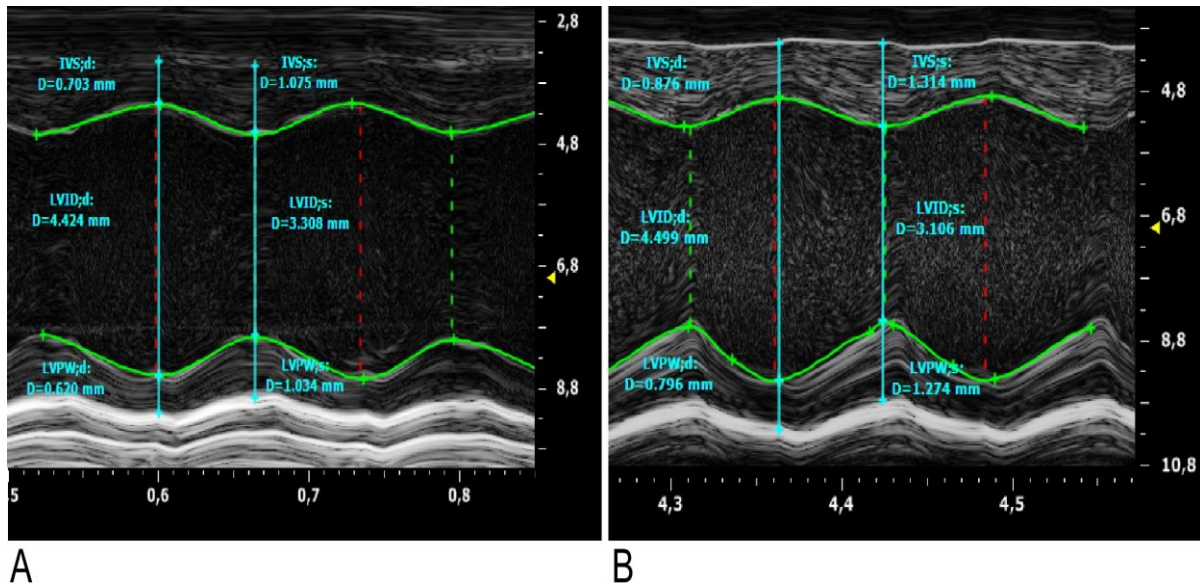
**Tab. 10: Morphologische Daten der Echokardiographie von TGM/hVLC1 und TGM/hVLC1<sup>E56G</sup> Mäusen.** Angegeben sind die Größen (jeweils in Systole und Diastole) für: intraventrikuläres Septum (IVSd und IVS sys), hintere Wand des linken Ventrikels (LVPWd und LVPW sys), linker Ventrikel (LVd und LV sys), prozentuale Verkürzung des Herzens in der Systole (FS), Herzrate (HR) und Gewicht linker Ventrikel-/Körpergewichtverhältnis (LVmass/BW), MW  $\pm$  SEM, N = Anzahl, P\* > 0.05 und P\*\* > 0.01 für Vergleich hVLC1 versus hVLC1<sup>E56G</sup>.

	TGM hVLC1	TGM hVLC1 <sup>E56G</sup>
LVmass/BW	4,68 $\pm$ 0,16	4,5 $\pm$ 0,13
HR (bpm)	448,5 $\pm$ 15,7	486,9 $\pm$ 15,4
IVSd (mm)	0,72 $\pm$ 0,02	0,79 $\pm$ 0,02**
IVS sys (mm)	1,05 $\pm$ 0,05	1,17 $\pm$ 0,03*
LVPWd (mm)	0,72 $\pm$ 0,02	0,78 $\pm$ 0,02*
LVPW sys (mm)	1,05 $\pm$ 0,04	1,16 $\pm$ 0,03*
LVd (mm)	4,35 $\pm$ 0,05	4,32 $\pm$ 0,08
LV sys (mm)	3,25 $\pm$ 0,09	3,05 $\pm$ 0,09
FS (%)	25,46 $\pm$ 1,73	29,64 $\pm$ 1,33
N	13	18

Die Untersuchungen der transgenen Mauslinien hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> zeigten keine signifikanten Veränderungen in der Herzmorphologie im Vergleich zu nichttransgenen C57/BL6 Tieren (Daten nicht gezeigt).

Drei Monate alte männliche hVLC1<sup>E56G</sup> Mäuse zeigten eine signifikante Vergrößerung des interventrikulären Septums im Vergleich zu hVLC1 Tieren sowohl in der Systole (1,17  $\pm$  0,03 mm vs. 1,05  $\pm$  0,05 mm) als auch in der Diastole (0,79  $\pm$  0,02 mm vs. 0,72  $\pm$  0,02 mm). Die hintere Wand des linken Ventrikels war ebenfalls sowohl in der Systole (1,16  $\pm$  0,03 mm vs. 1,05  $\pm$  0,04 mm) als auch in der Diastole (0,78  $\pm$  0,02 mm vs. 0,72  $\pm$  0,02 mm) bei den hVLC1<sup>E56G</sup> Mäusen signifikant vergrößert im Vergleich mit hVLC1 Mäusen. Damit zeigten die untersuchten hVLC1<sup>E56G</sup> Tiere schon sehr früh erste Anzeichen einer beginnenden Hypertrophie

unter Einbeziehung des interventrikulären Septums. Das Herz- / Körpergewicht-verhältnis zwischen den hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> Linien war nicht signifikant verschieden. Abbildung 38 zeigt beispielhaft die echokardiologische Untersuchung eines hVLC1 (Abb. 38A) bzw. eines hVLC1<sup>E56G</sup> Tieres (Abb. 38B). Dabei sind deutlich die erhöhten Werte für das IVS und LVPW im transgenen hVLC1<sup>E56G</sup> Tier zu erkennen.



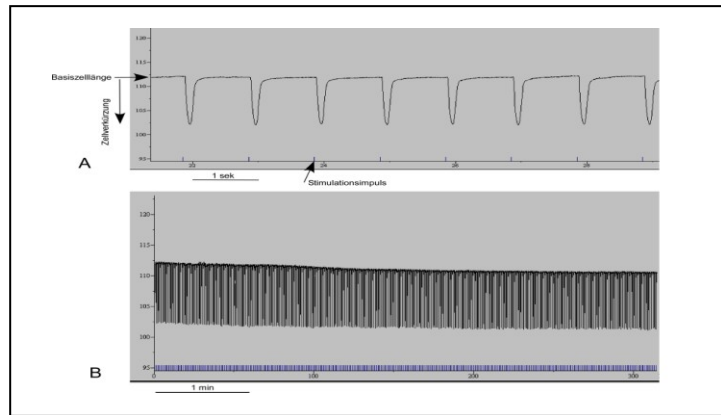
**Abb. 38: Echokardiographie M (motion)-Mode Bilder aus der kurzen Achse (parasternal) zweier transgener Mäuseherzen.** A) transgene hVLC1 Maus (Bock, 3 Monate, Nr.661), B) transgene hVLC1<sup>E56G</sup> Maus (Bock, 3 Monate, Nr.171), d - Diastole, sys - Systole, IVS - intraventrikuläres Septum, LVPW - hintere Wand des linken Ventrikels, LVID – innerer linker Ventrikeldurchmesser.

#### 3.9 Adulte isolierte Kardiomyozyten von transgenen hVLC1<sup>E56G</sup> Tieren zeigen eine verringerte Zell-Verkürzungsamplitude

Für Zell-Verkürzungsmessungen wurden adulte Kardiomyozyten aus den Herzen drei Monate alter männlicher Tiere der transgenen Mauslinien isoliert und die Parameter der Zellverkürzung, wie die prozentuale Zell-Verkürzungsamplitude, maximale Verkürzungs- und maximale Relaxationsgeschwindigkeit, bestimmt. Dazu wurden die isolierten Kardiomyozyten mit bipolaren elektrischen Impulsen von 20 mV mit 1 Hz und 5 ms Stimulationsdauer zur Kontraktion angeregt. Abbildung 39 zeigt exemplarisch die Aufzeichnung eines Versuches.



### 3. Ergebnisse

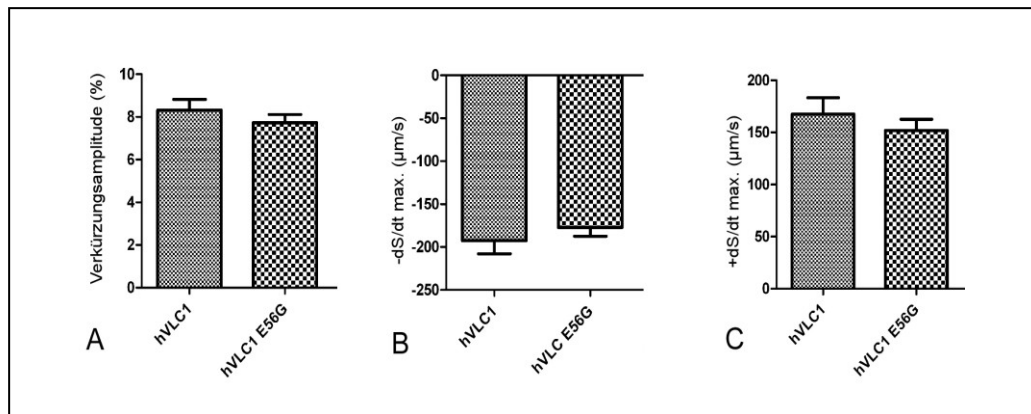


**Abb. 39: Exemplarische Darstellung der Zellverkürzungsmessung an einer isolierten Mauscardiomyozyte.** A) Verkürzungsamplitude einer Mauszelle der hVLC1 Linie 7385 stimuliert bei 1 Hz über den Zeitraum von 7 Sekunden. B) Versuchsablauf über den Gesamtzeitraum vom 5 min.

Alle gemessenen Werte für hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> sind als MW  $\pm$  SEM in Tabelle 11 und Abbildung 40 dargestellt. Zwischen den TGM/hVLC1 und TGM/hVLC1<sup>E56G</sup> Linien konnte eine tendenzielle Verringerung der prozentualen Verkürzung bei den E56G mutierten isolierten Kardiomyozyten registriert werden (hVLC1  $8,32 \pm 0,5$  % vs. hVLC1<sup>E56G</sup>  $7,73 \pm 0,39$  %). Ebenso waren die Kontraktions- (hVLC1  $192,5 \pm 15,38$  % vs. hVLC1<sup>E56G</sup>  $177,11 \pm 10,28$  %) und Relaxationsrate (hVLC1  $167,55 \pm 15,68$  % vs. hVLC1<sup>E56G</sup>  $151,97 \pm 10,56$  %) in den Zellen der E56G mutierten Tieren reduziert.

**Tab. 11: Zellverkürzungsmessungen von hVLC1, hVLC1<sup>E56G</sup> und C57/BL6 an transgenen isolierten Kardiomyozyten.** Angegeben sind die prozentuale Verkürzungsamplitude, maximale Verkürzungsgeschwindigkeit ( $-dS/dt$  max.), maximale Relaxationsgeschwindigkeit ( $+dS/dt$  max.), N = Anzahl der untersuchten Zellen, MW  $\pm$  SEM.

	Verkürzungs-Amplitude (%)	$-dS/dt$ max. ( $\mu m/s$ )	$+dS/dt$ max. ( $\mu m/s$ )	N
<b>hVLC1</b>	$8,32 \pm 0,50$	$-192,50 \pm 15,38$	$167,55 \pm 15,68$	35
<b>hVLC1<sup>E56G</sup></b>	$7,73 \pm 0,39$	$-177,11 \pm 10,28$	$151,97 \pm 10,56$	41



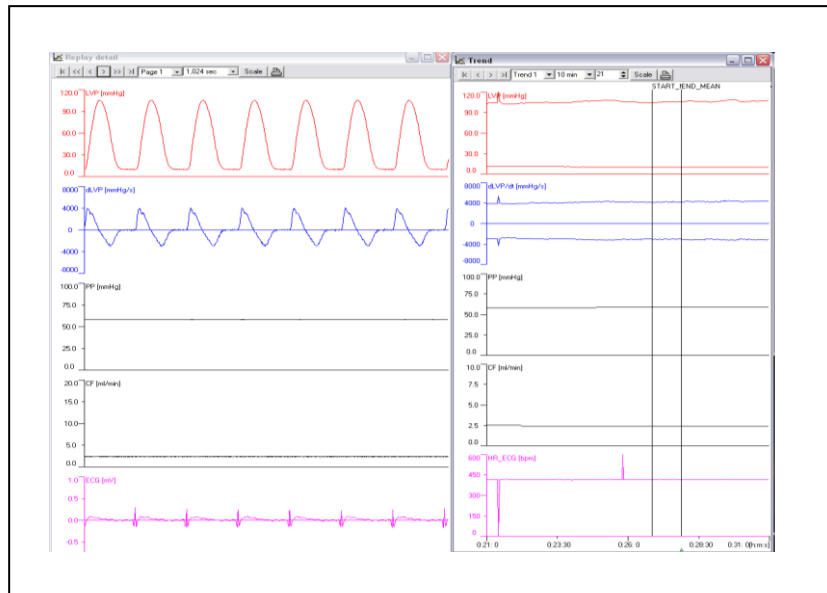
**Abb. 40: Graphische Darstellung der Zell-Verkürzungsparameter von isolierten hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> Mausekardiomyozyten.** A) zeigt die prozentuale Verkürzungsamplitude, B) die maximale Verkürzungsgeschwindigkeit (-dS/dt max.), C) die maximale Relaxationsgeschwindigkeit (+dS/dt max.). hVLC1 (kleinkarierte Balken, n=35), hVLC1<sup>E56G</sup> (großkarierte Balken, n=41).

Für beide transgenen Mauslinien hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> konnte im Vergleich zu nicht transgenen C56/BL6 Tieren eine tendenzielle Verbesserung der Parameter für prozentuale Verkürzung, Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

#### 3.10 Die E56G Mutation führt zu einer signifikant verringerten linksventrikulären Druckentwicklung und reduzierten Relaxationsraten in transgenen hVLC1<sup>E56G</sup> Tieren

Wie unter 2.10.1 beschrieben, wurden die Herzen der transgenen Mauslinien präpariert und als isoliert perfundierte Herzen nach Langendorff untersucht. Die Versuche wurden unter einem konstanten Aortendruck (Perfusionsdruck) von  $60,2 \pm 0,2$  mmHg durchgeführt und die Herzen der TGM/hVLC1 und TGM/hVLC1<sup>E56G</sup> Mäuse mit 414 Schlägen pro Minute elektrisch stimuliert. Die Auswertung erfolgte durch das Setzen von Markern über einen Zeitraum von 414 Schlägen (1 min). Abbildung 41 zeigt ein exemplarisches Beispiel für eine Langendorff-Versuchsaufzeichnung.

### 3. Ergebnisse



**Abb. 41: Originalregistrierung eines Langendorff Versuches.** Dargestellt sind (von oben) der entwickelte linksventrikuläre Druck (LVP in mmHg), Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit ( $\Delta$ LVP in mmHg/s), Perfusionsdruck (PP in mmHg), Koronarfluss (CF im ml/min) und Elektrokardiogramm (ECG in mV) jeweils im Detail (links, über 1,024 s) und als Trend (rechts, über 10 min) sowie die zur Auswertung gesetzten Marker (*start mean* und *end mean*, über 1 min).

Die Ergebnisse für den entwickelten linksventrikulären Druck (LVD), Kontraktionsgeschwindigkeit ( $+dLVD/dt \text{ max.}$ ), Relaxationsgeschwindigkeit ( $-dLVD/dt \text{ max.}$ ), Koronarfluss (KF) und das Herz-/Körpergewicht (HG/KG) sind in Tabelle 12 und Abbildung 42 zusammengefasst dargestellt.

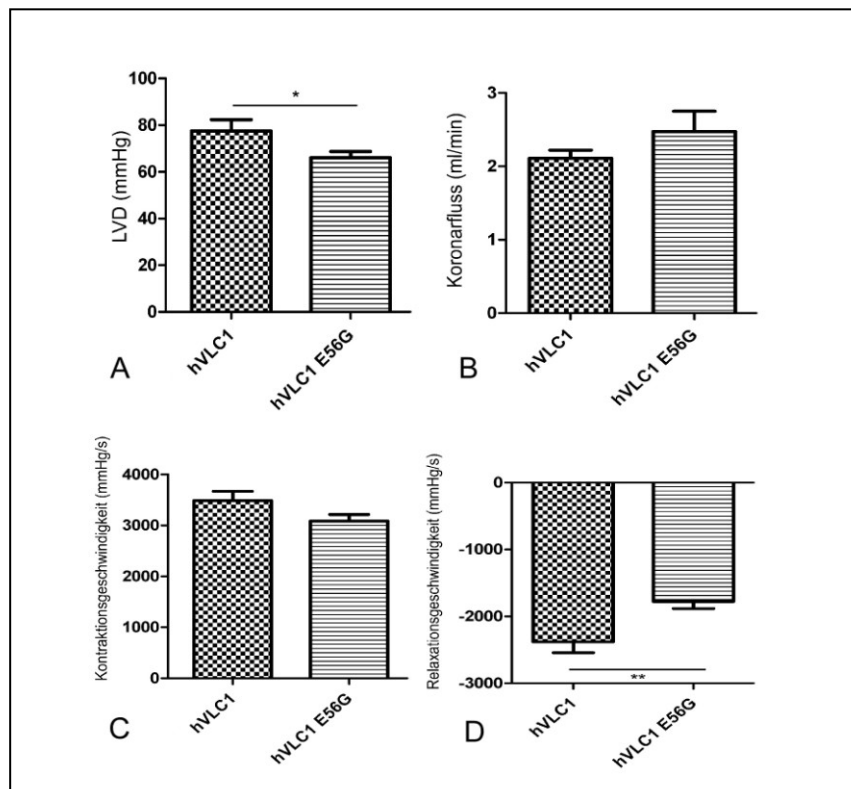
**Tab. 12: Ergebnisse der Langendorff-Versuche mit transgenen hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> Mäusen.** Dargestellt sind Herz-/Körpergewicht Verhältnis (HG/KG), entwickelter linksventrikulärer Druck (LVD), Kontraktionsgeschwindigkeit ( $+LVD/dt \text{ max.}$ ), Relaxationsgeschwindigkeit ( $-LVD/dt \text{ max.}$ ), Koronarfluss (KF), Anzahl der Untersuchten Tiere (N), alle Werte MW  $\pm$  SEM, \*P < 0.05, \* Vergleich zwischen hVLC1 vs. hVLC1<sup>E56G</sup>

	HG/KG (g/kg)	LVD (mmHg)	+dLVD/dt max. (mmHg/s)	-dLVD/dt max. (mmHg/s)	KF (ml/min)	(N)
<b>hVLC1</b>	9,51 $\pm$ 0,29	77,5 $\pm$ 4,8	3483,7 $\pm$ 184,2	-2378,9 $\pm$ 162,3	2,1 $\pm$ 0,1	11
<b>hVLC1<sup>E56G</sup></b>	9,35 $\pm$ 0,35	66,0 $\pm$ 2,7*	3083,4 $\pm$ 130,1	-1779,5 $\pm$ 101,1**	2,5 $\pm$ 0,3	19

Die E56G Mutation führte in transgenen Mäusen zu einer Verringerung der LVD-Parameter im Vergleich zu transgenen Tieren mit der nicht mutierten humanen leichten Myosinkette. Der entwickelte linksventrikuläre Druck der transgenen hVLC1<sup>E56G</sup> Tiere war mit 66,0  $\pm$  2,7 mmHg signifikant geringer als der linksventrikuläre Druck der hVLC1 Linien mit 77,5  $\pm$  4,8 mmHg (P\* < 0.05). Die

### 3. Ergebnisse

Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten waren ebenfalls im Verhältnis  $hVLC1 > hVLC1^{E56G}$  reduziert. So zeigten  $hVLC1^{E56G}$  Mäuse mit  $-1779,5 \pm 101,1$  mmHg/s eine signifikant verkürzte Relaxationsgeschwindigkeit im Vergleich zu transgenen Mäusen der  $hVLC1$  Linie mit  $-2378,9 \pm 163$  mmHg/s. Die Kontraktionsgeschwindigkeit war ebenfalls tendenziell in Tieren der  $hVLC1^{E56G}$  Linien reduziert ( $3083,4 \pm 130,2$  vs.  $3483,7 \pm 184,2$  mmHg/s). Abbildung 42 zeigt im Balkendiagramm die Werte für linksventrikulären Druck (A), Koronarfluss (B), Kontraktionsgeschwindigkeit (C) und Relaxationsgeschwindigkeit (D) im Vergleich zwischen TGM/ $hVLC1$  und TGM/ $hVLC1^{E56G}$ . Während die Kontraktionsgeschwindigkeit zwischen den beiden transgenen Gruppen nur tendenziell beeinflusst wurde, kam es bei der Relaxationsgeschwindigkeit und dem entwickelten linksventrikulären Druck zu einer signifikanten Verringerung bei den  $E56G$  mutierten Tieren. Koronarfluss und HW/KW-Verhältnis waren von keinen signifikanten Veränderungen betroffen.



**Abb. 42: Kontraktionseigenschaften der transgenen Mauslinien im Langendorff Versuch.** Dargestellt sind im Vergleich transgene  $hVLC1$  Tiere (karierte Balken,  $N = 11$ ) und transgene  $hVLC1^{E56G}$  Tiere (linierte Balken,  $N = 19$ ). A) zeigt den entwickelten linksventrikulären Druck (LVD, mmHg), B) Koronarfluss (KF, ml/min). C) die Kontraktionsgeschwindigkeit (+dLVD/dt max., mmHg/s), D) die Relaxationsgeschwindigkeit (-dLVD/dt max., mmHg/s). Angegeben sind Mittelwert  $\pm$  SEM,  $P^* < 0.05$ ,  $P^{**} < 0.01$ .

Die Substitution der murinen leichten Myosinketten mit der humanen Isoform, unabhängig von nativem oder mutiertem hVLC1 Protein, führte zu einer Verbesserung des LVD,  $+dLVD/dt$  max. und  $-dLVD/dt$  max. im Vergleich zu nicht transgenen C57/BL6 Tieren. Koronarfluss und Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnis (HG/KG) waren davon nicht betroffen (Daten nicht gezeigt).

### 4. Diskussion

Vererbare Mutationen in unterschiedlichen Sarkomerproteinen konnten bei familiärer und spontaner hypertropher Kardiomyopathie (HCM) als krankheitsauslösende Faktoren identifiziert werden. Es sind verschiedene klinische Phänotypen der hypertrophen Kardiomyopathie von milden bis schweren Verlaufsformen bekannt (Konno et al., 2011). Obwohl die Genotyp-Phänotyp-Korrelationen zwischen Mutation und Erkrankungsbild noch nicht endgültig geklärt sind, ist davon auszugehen, dass Mutationen in bestimmten Genen zu ungünstigeren Prognosen führen (Marian et al., 1998; Ackerman et al., 2002; Alcalai et al., 2008).

Zu den mit HCM assoziierten Mutationen gehören die fünf in dieser Arbeit untersuchten Mutationen im MYL3-Gen der essentiellen ventrikulären leichten Myosinkette (E56G, A57G, E143K, M149K und R154H) (Poetter et al., 1996; Lee et al., 2001; Olson et al., 2002; Richard et al., 2003). Derzeit sind die HCM auslösenden Pathomechanismen der verschiedenen Mutationen in der ELC nicht bekannt. Ebenfalls nicht vollständig geklärt sind die Ursachen für die Heterogenität der klinischen Phänotypen der durch die unterschiedlichen Mutationen ausgelösten hypertrophen Kardiomyopathie.

Das Zusammenwirken aller Sarkomerkomponenten in Kardiomyozyten führt zu einer normalen Funktionsweise und Kraftentwicklung des Herzens. Schon kleine Veränderungen, wie der Austausch einer Aminosäure in konservierten Bereichen von Sarkomerproteinen, können über Störungen in Struktur und Funktion des Sarkomers, im Energiehaushalt der Zellen oder über andere Pathomechanismen zu Kardiomyopathien führen. Daher sollte als Zielstellung der Arbeit die Auswirkungen der fünf Mutationen sowohl auf die Struktur als auch auf die Funktion des hVLC1 Proteins untersucht und beschrieben und, wenn möglich, ein Pathomechanismus formuliert werden.

Im ersten Schritt der Arbeit wurde die Affinität zwischen der essentiellen ventrikulären leichten Myosinkette bzw. ihrer mutierten Formen zu der IQ1 Bindungsstelle am Hebelarm der schweren Myosinkette untersucht, da gerade die

Bindung der ELC zur MyHC essentiell für die normale Kraftentwicklung ist (VanBuren et al., 1994).

Bei dem dazu verwendeten Fusionsprotein der schweren Myosinkette r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub> wurde die Bindungsstelle für die RLC über einen Alanin-Scan eliminiert (r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup>). Wie in der Studie von Petzhold et al. 2010 beschrieben, konnte mit einem r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub> Fusionsprotein, welches beide Bindungsstellen enthielt (IQ1, IQ2), nur eine geringe Affinität zur rVLC1 nachgewiesen werden ( $K_D \sim 1000$  nM). Nach Eliminierung der IQ2 Bindungsstelle der RLC über einen Alanin-Scan verringerte sich der  $K_D$ -Wert auf 35 nM. Zudem konnte ein Wechsel von einer gefalteten Form des r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub> Proteins zu einer gestreckten Struktur der r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup> beobachtet werden. Dieser offenere Aufbau der r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup> wurde auch als Grund für die im Vergleich mit der r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub> deutlich bessere Bindung der rVLC diskutiert (Petzhold et al., 2010). Sedimentations-Equilibrium-Zentrifugation bestätigte die erwartete Größe von 57 kDa und das, für die SPR-Analyse wichtige, monomere Vorliegen der r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup> in Lösung. Die schwere  $\beta$ -Myosinkette der Ratte konnte wegen der großen Homologie (89 %) zwischen Ratten- und Human-MyHC im Bereich der exprimierten Aminosäuren (664 – 915) und der identischen IQ1-Konsensussequenz (Bindungsmotiv der ELC) verwendet werden (Anhang 6.2). Für das verwendete humane VLC1 Protein konnte der für EF-Hand Strukturen typische hohe  $\alpha$ -helikale Anteil in der Sekundärstruktur nachgewiesen werden. Da in dieser Arbeit die Affinitäten der hVLC1 in normaler und mutierter Form untersucht werden sollten, wurde die offene r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup> Form des Proteins als Bindungspartner ausgewählt.

Für die Klärung funktioneller Veränderungen der MYL3-Mutationen wurde die Bindung zwischen hVLC1 und dem Hebelarm der schweren Myosinkette mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) untersucht. Dabei wurden die erhaltenen Werte für den normalen hVLC1/r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup>-Komplex mit denen der mutierten hVLC1/r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup>-Komplexe verglichen. Hierbei konnte eine hohe Affinität zwischen dem nativen hVLC1 und dem Hebelarm nachgewiesen werden ( $K_D = 41$  nM). Diese korreliert mit den 2011 bei Petzhold et al. beobachteten Werten ( $K_D = 37$  nM). Für alle mutierten Formen der humanen VLC1 konnte eine signifikant verringerte Affinität zur IQ1-Domäne des Hebelarms der MyHC im

Vergleich zum normalen hVLC1 Protein gezeigt werden (Lossie et al., 2011). Im Besonderen fiel in der vorliegenden Arbeit die E56G Mutation durch einen fast 30fach höheren  $K_D$ -Wert für den hVLC1<sup>E56G</sup>/MyHC-Komplex auf.

In einer Studie von Muthu et al. 2011 konnte im Gegensatz dazu keine signifikante Veränderung im  $K_D$ -Wert zwischen dem normalen bzw. der A57G mutierten hVLC1 zur schweren Myosinkette nachgewiesen werden. Die berechneten  $K_D$ -Werte lagen zudem mit 985 nM für den hVLC1/MyHC-Komplex bzw. 918 nM für den hVLC1<sup>A57G</sup>/MyHC-Komplex deutlich höher, als die in dieser Arbeit über SPR-Analyse ermittelten Werte. Dabei könnte die bei Muthu et al. 2011 für die Untersuchungen verwendete Methode des *overlay assays* für Messungen im nm  $K_D$ -Bereich eventuell weniger sensitiv gewesen sein, als die in dieser Arbeit für Protein-Protein-Bindungsstudien optimierten SPR-Analyse. Tendenziell war jedoch auch in der SPR-Analyse die Bindungsaffinität zwischen dem normalen hVLC1/MyHC- und dem hVLC1<sup>A57G</sup>/MyHC-Komplex am geringsten von allen Mutationen beeinflusst.

Eine schwingende Bewegung des Halsbereiches der MyHC relativ zum katalytischen Zentrum gilt als Ursprung der Filamentbewegung. Der Halsbereich wirkt dabei als Hebelarm, dessen Steifheit die maximal mögliche Kraftentwicklung beeinflusst. Eine Erhöhung der Hebelarmsteifheit wäre daher mit einer Steigerung der Kraftentwicklung verbunden (Howard et al., 1996). Davon ausgehend, könnte die geringe Affinität der mutierten hVLC1<sup>E56G</sup>/MyHC-Konstrukte zu einer Verringerung der Federkonstante des Hebelarms und darüber auch zur Verminderung der Kraftentwicklung der einzelnen Myosinquerbrücken führen.

Allgemein gilt nach dem Hookschen Gesetz:

$$(1) \quad F = \kappa \Delta X$$

mit  $F$  = Federkraft,  $\Delta X$  = Auslenkung,  $\kappa$  = Federkonstante

Bezogen auf den schwingenden Myosin-Hebelarm mit der Länge  $L$ , dem Elastizitätsmodul  $E$  und dem Trägheitsmoment  $I$  gilt für die Federkonstante  $\kappa$



$$(2) \quad \kappa = 3EI/L^3$$

und somit (3) 
$$F = \kappa \Delta X = (3EI/L^3) \Delta X$$
  
(Feynman et al. 1964, Uyeda et al., 1996)

Dabei gilt, dass die maximal entwickelte Kraft abhängig von der Länge und der Federkonstante des Hebelarmes ist. So sind die Größe der einzelnen Myosinkopfbewegungen und daher die Geschwindigkeit der Aktinfilamentbewegung linear von der Länge des Hebelarms abhängig (Uyeda et al., 1996). Für die Bestimmung der Federkonstante  $\kappa$  erfolgt die Berechnung des Elastizitätsmoduls  $E$  unter der Annahme, dass sich der  $\alpha$ -helikale Hebelarm mit seinen zwei leichten Ketten (ELC, RLC) wie ein *coiled-coil* (zwei umeinander gewundene  $\alpha$ -Helices) verhält (Uyeda et al., 1996). Ein Verlust der normalen Bindung der leichten Ketten, aufgrund einer geringen Affinität zum Hebelarm, könnte die Steifheit der *coiled-coil*-Struktur negativ beeinflussen und damit die Federkonstante reduzieren.

So wird angenommen, dass die Eigenschaften der verschiedenen Isoformen der leichten Ketten die Federkonstante des Hebelarmes beeinflussen könnten und darüber die Kraft, die ein Myosinmolekül generiert, regulieren. Somit wäre es denkbar, dass auch eine Reduzierung der Affinität zwischen hVLC1 und dem Hebelarm aufgrund von Mutationen, über die Verringerung der Federkonstante, zur Verminderung der von den einzelnen Myosinquerbrücken erzeugten Kraft führen könnte. Damit wäre dann möglicherweise auch der Beginn einer Hypertrophie verbunden.

Da es im Rahmen der Doktorarbeit nicht möglich war, alle fünf Mutationen weiter zu untersuchen, wurden die anschließenden Versuche mit der besonders auffälligen E56G mutierten leichten Myosinkette durchgeführt. Als Vergleichs- und Kontrollgruppe für die folgenden Experimente wurde die native hVLC1 ausgewählt.

Bei der E56G Mutation handelt es sich um einen Aminosäureaustausch in einem konservierten Bereich des hVLC1 Proteins (Hernandez et al., 2007) (Abb. 43). Dabei erfolgt der Austausch von Glutaminsäure (E), einer sauren Aminosäure mit

geladener hydrophiler Seitenkette, gegen Glycin, die kleinste und einfachste neutrale Aminosäure mit hydrophober Seitenkette.

H. sapiens	NP 000249.1	16	APKAAP-----APAPPPEPERPKEVEFDASKIKIEFTPEQIEEFKEAFMLFDRTPKCEMKITYGQCGDVLRL
C. lupus	XP 533849.1	16	GQKAAPAP--APAPAPAPAPPEPERPKEAEFDASKIKIEFTPEQIEEFKEAFMLFDRTPKCEMKITYGQCGDVLRL
B. taurus	XP 001790552.1	49	GAKAAA----APAPAPAPPPAPEPSKEPEFDPSKIKIEFTPEQIEEFKEAFTLFDRTPKCEMKITYGQCGDVLRL
M. musculus	NP 034989.1	17	APKAAPAPAAAPAAAPAAPEPERPKEAEFDASKIKIEFTPEQIEEFKEAFLFDRTPKGEMKITYGQCGDVLRL
R. norvegicus	NP 036738.1	17	APKAAP----APAAAPAAPEPERPKEAEFDASKIKIEFTPEQIEEFKEAFQLFDRTPKGEMKITYGQCGDVLRL
G. gallus	NP 990490.1	18	EPKPAP-----KPAEPEPKKEVEFNPASIKVEFTPDQIEEFKEAFSLFDRTPKSEMKITAYQCGDVLRL
D. rerio	XP 001921730.1	12	AAKPAP-----PPEPEPKPEQFDLKSIVKVEFTADQIEEFKETFMLFDRTPAEMKITAYQCGDVMRL

**Abb. 43: Sequenzvergleich von ELC-Isoformen in verschiedenen Spezies im Bereich der konservierten E56 Aminosäure (rot markiert).**

Proteine bilden ihre Sekundärstruktur ( $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt, Random-coil) über Wasserstoffbrückenbindungen bzw. ihre Tertiärstruktur über Eigenschaften der Seitenketten der Aminosäuren, d.h. über kovalente (Disulfidbrücken) und nichtkovalente Bindungen (Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe-, ionische-, Van-der-Waals-Kräfte) aus. Die deutlichen Unterschiede in den Eigenschaften der substituierten Aminosäure, sauer - neutral, groß - klein, geladene hydrophile Seitenkette - hydrophobe Seitenkette, könnten zu Veränderungen bei der Ausbildung der Sekundär- (z.B. plötzlicher Abbruch einer  $\alpha$ -Helix) und Tertiärstruktur (Verlegung von Bindestellen o.ä.) des Proteins führen. Dabei wäre es möglich, da sich die Mutation in der Bindedomäne der hVLC1 zur schweren Myosinkette befindet, dass die beobachtete Beeinträchtigung der Affinität des hVLC1<sup>E56G</sup>/MyHC Komplexes aufgrund einer veränderten räumlichen Struktur des mutierten Proteins entsteht.

Die E56G Mutation scheint jedoch keine Veränderung in der Sekundärstruktur des hVLC1 Proteins auszulösen, die stark genug wäre, um im CD-Spektrum nachweisbar zu sein. Mutiertes und natives Protein zeigten den für EF-Hand Proteine typischen hohen Anteil an  $\alpha$ -helikalen Strukturen. Auch die Thermostabilität war durch die Mutation nicht beeinflusst (Lossie et al., 2011). Dabei lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass andere Untersuchungsmethoden, wie z.B. Infrarotspektroskopie (FTIR) oder Röntgen-Kristallstruktur-Analysen, eine durch die Mutation ausgelöste Veränderung im strukturellen Aufbau nachweisen könnten.

Die räumliche Struktur der mutierten hVLC1 wurde daher im Weiteren mit Hilfe der *fluorescence lifetime imaging microscopy* (FLIM) untersucht. So konnte für das

hVLC1<sup>E56G</sup> mutierte Protein in permeabilisierten Muskelfasern eine signifikant längere Fluoreszenzdauer im Vergleich zum nativen Protein dokumentiert werden (Lossie et al., 2011). Über die Fluoreszenzlebensdauer kann das Mikromilieu einer mit einem Fluorophor markierten Probe untersucht werden. Diese wird dabei von der Elastizität und Konformation der fluorophormarkierten Region beeinflusst (Suhling et al., 2005; Ushakov et al., 2011). Die mit Coumarin gelabelte Cys-AS-67 befand sich hierbei in großer räumlicher Nähe zu der mutierten Aminosäure E56G. Die Abweichung von Fluoreszenzzeiten zwischen zwei Proben (hVLC1 ↔ hVLC1<sup>E56G</sup>) wird im Allgemeinen mit einem Shift der Coumarin-markierten Bereiche in eine mehr verdeckte bzw. exponiertere Position innerhalb des Proteins assoziiert. Daher ist davon auszugehen, dass die Substitution der Aminosäure (E → G) doch die räumliche Struktur des mutierten Protein beeinflusst. Weiterführende Untersuchungen müssten klären, wie und in welchem Maße, bestimmte Regionen der hVLC1<sup>E56G</sup> Proteinstruktur beeinträchtigt sind.

Der in den Protein-Protein-Bindungsstudien dokumentierte hohe  $K_D$ -Wert für den hVLC1<sup>E56G</sup>/rβ-MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup>-Komplex und die ebenfalls veränderte Fluoreszenzzeit ließen eine gestörte Inkorporierung der hVLC1<sup>E56G</sup> in das Sarkomer vermuten. Daher wurde im Rahmen der Arbeit ein Sorting Assay von hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> in neonatalen Rattenkardiomyozyten durchgeführt. Tatsächlich konnte bereits in Einzeltransfektionsversuchen beobachtet werden, dass es in nahezu allen Zellen zu einem besseren Einbau von hVLC1 in das Sarkomer im Vergleich zum niedrig-affinen hVLC1<sup>E56G</sup> kam. Während hVLC1 sowohl in Einzel- als auch in Ko-transfektionen nach 18 Stunden deutlich in die A-Bande (ohne H-Zone) des Sarkomers in den Kardiomyozyten integriert wurde, kam es bei dem mutierten hVLC1<sup>E56G</sup> Protein in den Einzeltransfektionen zu einem verzögerten Einbau in das Sarkomer. Bei Ko-Transfektionen mit kompetitivem Einbau beider Proteine in die Zelle wurde das hVLC1 Protein, entsprechend seiner geringeren Affinität zum Hebelarm, von der hVLC1 verdrängt (Lossie et al., 2011). Unterschiedliche Einbaueigenschaften in das Sarkomer (*sorting specificity*) konnten auch für verschiedene ELC Isoformen nachgewiesen werden (Komiya et al., 2000; Petzhold et al., 2011). Die auf Zellebene im Sorting Assay dokumentierte verschlechterte Inkorporation der E56G mutierten hVLC1 in das Sarkomer befindet

sich im Einklang mit der in der SPR-Analyse beobachteten geringen Affinität zwischen hVLC1<sup>E56G</sup> und der r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup>.

Es wurden verschiedene Mechanismen für die Veränderungen der Struktur und Funktion von Sarkomerproteinen durch Mutationen beschrieben. Bei der sogenannten Haploinsuffizienz ist über den Abbau der mRNA oder des mutierten Proteins die Menge funktionsfähigen Proteins herabgesetzt. Dies führt zur Störung in der Aktivität des Sarkomers (Marston et al., 2009; van Dijk et al., 2009; Tripathi et al., 2011). Ebenso ist jedoch ein als dominant-negativer Effekt bezeichneter Vorgang möglich, der durch die Integration des mutierten dysfunktionalen Proteins in das Sarkomer ausgelöst wird. Ein gesteigerter Energieverbrauch oder Veränderungen in der Kalzium-Homöostase könnten die Lebensdauer der Kardiomyozyten verringern und ein Ersatz durch fibrotisches Gewebe auftreten (Bonne et al., 1998; Seidman et al., 2001; Hernandez et al., 2005; Volkman et al., 2007). Um den hypertrophen Phänotyp der E56G Mutation zu rekapitulieren und die Mechanismen einer veränderten Funktion des Myosins zu untersuchen, wurde für *in vivo* und *in vitro* Studien erstmals ein transgenes Mausmodell generiert und charakterisiert. Die transgene Mauslinie hVLC1<sup>E56G</sup> (TGM/hVLC1<sup>E56G</sup>) exprimierte und substituierte in ihren Myofibrillen die E56G mutierte humane ventrikuläre essentielle leichte Myosinkette gegen die endogene murine VLC1 (mVLC1), während die TGM/hVLC1 als Kontrolllinie diente. Diese Tiere substituierten die mVLC1 gegen die native humane VLC1 Form.

Über Untersuchungen der M149V Mutation in verschiedenen Studien (Vemuri et al., 1999; Sanbe et al., 2000; James et al., 2002) wurde eine Speziespezifität der Mutationen der leichten Myosinketten festgestellt. Da der hypertrophe Phänotyp im Tiermodell rekapituliert werden sollte, wurde die humane essentielle leichte ventrikuläre Myosinkette über den transgenen Ansatz in das Mausmodell eingebracht und nicht die murine VLC1 mutiert.

Die Charakterisierung der transgenen Tiere erfolgte mittels Genotypisierungs-PCR auf das eingefügte Konstrukt und dem Nachweis hoher mRNA Level für hVLC1 bzw. hVLC1<sup>E56G</sup> im Herzgewebe der transgenen Mäuse. Durch die Verwendung von aufgereinigten Myofibrillen wurde ausgeschlossen, dass nicht gebundenes, also

zytoplasmatisch vorliegendes, humanes Protein als substituiert angesehen wurde. Ähnliche bzw. höhere Substitutionslevel konnten in der Studie über die A57G Mutation von Muthu et al. 2011, ebenfalls mit dem herzspezifischen  $\alpha$ -MyHC-Promoter, dokumentiert werden.

In SDS-Gelen und Westernblotanalysen konnte der erfolgreiche Austausch der murinen ELC gegen die humane Form auf Proteinebene (rund 36 %) sowohl in hVLC1 als auch in hVLC1<sup>E56G</sup> Tierlinien nachgewiesen werden. Es ist somit anzunehmen, dass kein Abbau der mRNA oder des mutierten Proteins erfolgt, und somit keine Haploinsuffizienz in den transgenen E56G Tieren im Vergleich zum normalen hVLC1 vorliegt. Dies ist jedoch nur als Beobachtung für das Tiermodell anzusehen. Ob diese Aussage auch auf den Menschen zu übertragen ist, müssten Untersuchungen an Patientengewebe zeigen.

Über *in vivo* Versuche konnte mittels Echokardiographie (Echo) von hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> Tieren erstmals im transgenen Mausmodell die Relevanz der E56G Mutation in der Entstehung der HCM nachgewiesen und die Auswirkungen näher untersucht werden. Über den Vergleich mit nicht transgenen C57/BL6 Tieren (keine sign. Veränderungen, Daten nicht gezeigt) konnte belegt werden, dass nicht durch den Insertionsort des transgenen Konstruktes hypertrophe Veränderungen in den Herzen ausgelöst wurden, sondern erst die E56G Mutation zu morphologischen Veränderungen im Vergleich zu hVLC1-Kontrolltieren führten. Die beobachtete signifikante Hypertrophie der hinteren linken Ventrikelwand unter Einbeziehung des interventrikulären Septums in hVLC1<sup>E56G</sup> Tieren lässt dabei eine obstruktive Form der HCM vermuten. Dabei kommt es zu diesem Zeitpunkt noch nicht zu einer signifikanten Verkleinerung des linken Ventrikeldurchmessers. Dies liegt wahrscheinlich in dem Verhältnis der Zunahme des IVS und der LVPW um circa 0,1 mm zum dazu relativ großen Durchmesser des Ventrikels (3 – 4 mm) begründet, welche in der Echokardiographie noch nicht signifikant nachgewiesen werden kann. Ein verringerter Durchmesser des linken Ventrikels könnte jedoch später bei älteren Tieren mit stärkerer Hypertrophie zu beobachten sein. Somit konnte erstmals im E56G-Mausmodell die beim Patienten auftretende Hypertrophie bereits in einem frühen Stadium rekapituliert werden.

In keiner weiteren Studie zu Mutationen in der humanen ELC wurde in einem Mausmodell zu einem so frühen Zeitpunkt eine Hypertrophie beobachtet. Bei Vemuri et al. 1999 war im transgenen M149V-Tiermodell erst mit einem Alter von einem Jahr in hVLC1<sup>M149V</sup> Tieren eine Hypertrophie der Papillarmuskeln und des umliegenden Gewebes nachzuweisen. Keine Hypertrophie sondern Anzeichen für Fibrose und Myozyten-Disarray konnten Muthu et al. 2011 in ihrer transgenen hVLC1<sup>A57G</sup> Tierlinie mit 10 - 12 Monaten belegen. In diesem Zusammenhang könnte der frühzeitige Beginn der morphologischen Veränderungen im Herzen der E56G mutierten Tieren auf eine besonders schwerwiegende Störung hindeuten. Dabei wäre von Interesse zu wissen, ob der mit der E56G Mutation diagnostizierte Patient, ebenfalls eine früh einsetzende Form der HCM aufwies. Für weitere Aussagen zum Fortschreiten der Hypertrophie sollten die transgenen hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> Tiere zu einem späteren Zeitpunkt mit einem höheren Alter (z.B. mit einem Jahr) im Echo oder MRT (Magnetresonanztomographie) untersucht und histologische Färbungen auf Fibrose oder Myozyten-Disarray durchgeführt werden.

In adulten Mäusen mit HCM und in geringerem Maße im Menschen, da diese vorherrschend die beta-MyHC exprimieren, ist oftmals eine Veränderung in der Expression von der alpha-MyHC in Richtung beta-MyHC im Herzen zu beobachten (Krenz et al., 2004; Miyata et al., 2000). Diese ist mit entsprechenden Veränderungen verschiedener Parameter, wie z.B. einer geringeren ATPase-Aktivität und Gleitgeschwindigkeit der Filamente bei beta-Myosin verbunden. Während die  $\beta$ -Myosin Isoform als die energetisch günstigere betrachtet wird, ist die gleichzeitig damit verbundene reduzierte Herzleistung von deutlich größerem Nachteil (Lowes et al., 1997; Krenz et al., 2004). Die im Alter von drei Monaten durchgeführte Untersuchung der transgenen E56G Tiere über SDS-Gele nach Carraro et al. 1983 konnte keinen Shift zum  $\beta$ -Myosin nachweisen, obwohl in der Echokardiographie bereits erste Anzeichen einer Hypertrophie erkennbar waren. Das junge Alter der für die Versuche verwendeten transgenen Tiere und die gerade erst beginnende Hypertrophie der Herzen könnten ursächlich dafür sein, dass die Veränderung in den Expressionleveln noch nicht vollständig eingetreten war. Zudem war auch noch keine Veränderung des Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnisses zwischen hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> Tieren aufgetreten. Die im Folgenden beobachteten funktionellen Veränderungen in den transgenen hVLC1<sup>E56G</sup> Tieren waren somit auf die

Auswirkungen der E56G Mutation zurückzuführen und nicht auf einen Shift in der Myosinexpression. Die  $\alpha$ -/  $\beta$ -Myosinverteilung und die davon abhängigen Parameter sowie die untersuchten funktionellen Größen, wie Zell-Verkürzung oder LVP, sollten zu einem späteren Zeitpunkt in älteren Tieren überprüft werden.

Zurzeit werden unterschiedliche Wirkungsweisen der durch Sarkomer-Mutationen ausgelösten Veränderungen diskutiert. Einige Studien unterstützen mit ihren Ergebnissen die Hypothese, dass Mutationen beispielsweise in Myosinkomponenten eine Reduzierung der Motorfunktion des Sarkomers (*loss of function*) und eine wahrscheinlich zu Beginn kompensatorische Hypertrophie auslösen (Geisterfer-Lowrance et al., 1996; Mettikolla et al., 2011). Es wurden jedoch auch Untersuchungen über Mutationen im Myosin-Gen publiziert, welche eine anfängliche Verbesserung der Herzleistung (*gain of function*) postulieren (Tyska et al., 2000; Palmiter et al., 2000), die dann, z.B. über eine verschlechterte Energiebilanz oder eine durch Überbeanspruchung ausgelöste gestörte Myofibrillenstruktur, zur HCM führen. Ob mit HCM assoziierte Mutationen zu einer reduzierten oder gesteigerten Myosinfunktion führen, ist somit noch nicht abschließend geklärt und unter Umständen von der individuellen Mutation abhängig. Die im Rahmen dieser Arbeit erfolgte Etablierung der transgenen Mauslinien hVLC1<sup>E56G</sup> und hVLC1 ermöglichte erstmalig die Untersuchung von Einzelzellen und vollständigen Herzen auf funktionelle Auswirkungen der E56G Mutation.

Der Einbau von mutiertem hVLC1 in isolierte adulte Kardiomyozyten ging, im Gegensatz zum Einbau des nativen Protein, mit einem negativen Effekt auf die Kontraktilität der Zellen einher. Dabei zeigten Einzelzellen transgener hVLC1<sup>E56G</sup> Tiere eine tendenzielle Verringerung der prozentualen Zell-Verkürzungsamplitude als auch eine tendenzielle Reduzierung der maximalen Verkürzungs- und maximalen Relaxationsraten. Hierbei könnte sowohl die Erhöhung der Anzahl der untersuchten Zellen als auch ein im höheren Alter der Tiere vielleicht verstärkt auftretender Effekt diese Tendenz zu einer Signifikanz führen. Möglich wäre auch, dass erst die Summation aller Einzelzellen zum gesamten Herzen die verringerte Kontraktilität zu diesem Zeitpunkt signifikant deutlich werden lässt.

Die Parameter des isoliert perfundierten Herzens bestätigten den bei der Zellverkürzung beobachteten Effekt des *loss-of-function* durch die E56G Mutation. Hierbei waren der vom Herzen entwickelte linksventrikuläre Druck sowie die Relaxationsgeschwindigkeit signifikant reduziert. Somit kam es in den Herzen der transgenen hVLC1<sup>E56G</sup> Tieren aufgrund der Mutation zu einem Verlust an Kontraktionskraft, was die Herzleistung insgesamt beeinträchtigen würde. Diese Veränderungen können systemisch, durch eine Steigerung des sympathischen Tonus, ausgeglichen werden. Aus Tiermodellen ist dabei bekannt, dass über eine dauerhafte gesteigerte Erregung des sympathischen Nervensystems Kardiomyopathien hervorgerufen werden können (Geisterfer-Lowrance et al., 1996; James et al., 1999; Robbins, 2000). Ein erhöhter Sympathikotonus äußert sich unter anderem durch einen Blutdruckanstieg und eine Herzfrequenzsteigerung. Während der Blutdruck der transgenen hVLC1<sup>E56G</sup> Tiere *in vivo* nicht bestimmt wurde, zeigten die E56G-Mäuse zumindest eine tendenzielle ( $p = 0,09$ ) Zunahme der Herzrate. Die reduzierte Relaxationsrate ist zudem an eine verringerte Fähigkeit des Herzens zur Entspannung in der Diastole gekoppelt.

Untersuchungen der ebenfalls in der hVLC1 auftretenden M149V Mutation durch Vermuri et al. 1999 konnten einen Einfluss der Mutation auf die durch Dehnung ausgelöste Aktivierung (*stretch-activation response*) von Papillarmuskelfasern und eine Reduzierung der oszillatorischen Kraftentwicklung im Frequenzbereich physiologischer Herzraten belegen. Somit wurde von den Autoren für die M149V Mutation ebenfalls ein *loss-of-function* Mechanismus beschrieben und im folgenden eine Veränderung in der Steifheit des Hebelarms als Ursache der beobachteten Modifikationen diskutiert. Im transgenen Mausmodell der A57G Mutation von Muthu et al. 2011 konnten ein reduzierter Myofilamentabstand sowie eine erhöhte Steifheit von Papillarmuskelfasern in Rigorlösung nachgewiesen werden. Die verstärkte Steifheit der Muskelfasern wurde dabei auf eine vergrößerte Steifheit der einzelnen Myosinquerbrücken (Hebelarmbereich) zurückgeführt und daher eine gesteigerte Kraftentwicklung durch die A57G Mutation postuliert (*gain of function*). Somit führten MYL3-Gen Mutationen im Tiermodell in Abhängigkeit von der jeweiligen Mutation zu einem *loss-* oder *gain of function*.



Als einen möglichen Pathomechanismus zur Entstehung der HCM durch die E56G Mutation lässt sich schlussfolgernd zusammenfassen:

Aufgrund der Ergebnisse der strukturellen (CD-Spektren, Schmelzkurven, FLIM) und funktionellen Untersuchungen (Protein-Protein-Bindungsstudien, Sorting-Assay, Zell-Verkürzungsmessungen, isoliert perfundiertes Herz nach Langendorff) ist davon auszugehen, dass eine im hVLC1<sup>E56G</sup> Protein auftretende Strukturveränderung, hervorgerufen durch den E→G Aminosäureaustausch, zu einer signifikant verringerten Affinität zwischen dem hVLC1/MyHC-Komplex führt und somit eine Reduzierung der Federkonstante, d.h. der Steifheit des Hebelarms, eintritt. Damit wäre die Kraft, die der „molekulare Motor“ Myosin erzeugen kann, vermindert und der Einbau des dysfunktionalen hVLC1<sup>E56G</sup> Proteins in die Myofibrillen führte zu einem *loss-of-function*. Die in den Tieren beobachteten morphologischen Veränderungen des Herzens lassen eine obstruktive Hypertrophie, ausgelöst durch die reduzierte Kraftentwicklung, vermuten.

Abschließend möchte ich die wichtigsten Ergebnisse meiner Arbeit nochmals in einer kurzen Zusammenfassung darstellen:

1. Missensmutationen in der essentiellen leichten ventrikulären Myosinkette beeinflussen das Bindungsverhalten des VLC/MyHC Komplexes. Alle fünf in Bindungsstudien untersuchten Mutationen führten zu einem signifikanten Verlust an Affinität zur IQ1 Bindungsdomäne am Hebelarm der schweren Myosinkette im Vergleich zum nativen Protein.
2. Besonders die mit dem Austausch der sehr unterschiedlichen Aminosäuren Glutaminsäure (sauer, größer, mit hydrophiler Seitengruppe) gegen Glycin (kleinste und einfachste AS mit hydrophober Seitengruppe) einhergehende Mutation (E56G) wies ein sehr stark reduziertes Bindungsverhalten (30fach schwächer) zur schweren Myosinkette auf.
3. Die native humane leichte Myosinkette wird im kompetitiven Sorting Assay bevorzugt in das Sarkomer transfizierter neonataler Rattenkardiomyozyten

eingebaut. Das E56G mutierte Protein wies hier, wie bei den Bindungsstudien, eine deutlich verringerte Affinität zur schweren Kette und damit eine reduzierte Inkorporierung ins Sarkomer auf. Es liegt stattdessen vermehrt zytoplasmatisch vor.

4. Die Substitution von hVLC1<sup>E56G</sup> erhöht die Fluoreszenzlebensdauer in permeabilisierten Psoas- und Soleus-Muskelfasern signifikant. Somit wird wahrscheinlich eine Veränderung in der Proteinstruktur durch die E56G Mutation ausgelöst.
5. Die humane essentielle ventrikuläre leichte Myosinkette (hVLC1) sowie die E56G mutierte Form (hVLC1<sup>E56G</sup>) wird im transgenen Mausmodell im Herzen exprimiert und gegen die endogene murine VLC1 substituiert.
6. In transgenen Tieren sind ähnlich hohe Level an mRNA für hVLC1 bzw. hVLC1<sup>E56G</sup> nachweisbar. Des Weiteren erfolgt die Substitution in die Myofibrillen in einem vergleichbaren Maße. Es kommt nicht zu Abbau oder Reduzierung der mutierten mRNA oder des dysfunktionalen Proteins im Vergleich zur nativen Form.
7. Die beobachteten Unterschiede zwischen transgenen hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> Tieren ist nicht auf einen Shift von alpha- zu beta-Myosin zurückzuführen.
8. Transgene männliche hVLC1<sup>E56G</sup> Tiere zeigen im Alter von 3 Monaten hypertrophe Veränderungen in der echokardiologischen Untersuchung. Dabei waren das interventrikuläre Septum (IVS) und die hintere linke Ventrikelwand (LVPW) in Systole und Diastole signifikant vergrößert. Somit zeigten die transgenen hVLC1<sup>E56G</sup> Tiere eine frühe hypertrophe Veränderung der Herzen aufgrund der E56G Mutation.
9. Die Kontraktionseigenschaften isolierter adulter Kardiomyozyten wurden durch die E56G Mutation tendenziell negativ beeinflusst. In adulten Kardiomyozyten von transgenen hVLC1<sup>E56G</sup> Tieren waren Zell-Verkürzungsamplitude, Kontraktions- und Relaxationsraten reduziert.

Die E56G Mutation löste in Kardiomyozyten einen negativ inotropen (verringerte prozentuale Zell-Verkürzungsamplitude) und negativ lusitropen (reduzierte Relaxationsrate) Effekt aus.

10. Im isoliert perfundierten Herzen nach Langendorff entwickelten die transgenen E56G Tiere einen signifikant geringeren linksventrikulären Druck und eine signifikant verringerte Relaxationsgeschwindigkeit im Vergleich zu transgenen hVLC1 Tieren. Die E56G Mutation führt damit zu einem *loss-of-function*.
11. Der wahrscheinlich aufgrund von Veränderungen in der Proteinstruktur auftretende Verlust an Affinität zwischen der mutierten hVLC1<sup>E56G</sup> und dem Hebelarm der schweren Myosinkette führt zu einer Reduzierung der Federkonstante des Hebelarms und somit zu einer verringerten Kraftentwicklung des Myosinmoleküls mit nachfolgender kompensatorischer Hypertrophie

## 5. Literaturverzeichnis

- Abdelaziz A.I., Pagel I. *et al.*, Human atrial myosin light chain 1 expression attenuates heart failure. *Adv Exp Med Biol* 2005, 565:283-292; discussion 292, 405-215.
- Ackerman M.J., VanDriest S.L. *et al.*, Prevalence and age-dependence of malignant mutations in the beta-myosin heavy chain and troponin T genes in hypertrophic cardiomyopathy: a comprehensive outpatient perspective. *J Am Coll Cardiol* 2002, 39:2042–2048.
- Alcalai R., Seidman J.G. *et al.*, Genetic Basis of Hypertrophic Cardiomyopathy: From Bench to the Clinics. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2008, 19:104-110.
- Alvarez J.L., Petzhold D. *et al.*, Ahnak1 modulates L-type Ca(2+) channel inactivation of rodent cardiomyocytes. *Pflugers Arch* 2010, 460:719-730.
- Arad M., Penas-Lado M. *et al.*, Gene mutations in apical hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2005, 112:2805-2811.
- Arras M., Autenried P. *et al.*, Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. *Comp Med* 2001, 51:443-456.
- Arrell D.K., Neverova I. *et al.*, Proteomic analysis of pharmacologically preconditioned cardiomyocytes reveals novel phosphorylation of myosin light chain 1. *Circ Res* 2001, 89:480-487.
- Aydt E.M., Wolff, G. *et al.*, Molecular modeling of the myosin-S1(A1) isoform. *J Struct Biol* 2007, 159:158-163.
- Bähler, M., Are class III and class IX myosins motorized signalling molecules? *Biochim Biophys Acta* 2000, 1496:52-59.
- Becker W., Bergmann A. *et al.*, Fluorescence lifetime imaging by time-correlated single-photon counting. *Microsc Res Tech* 2004, 63:58-66.
- Behlke J., Ristau O., Molecular mass determination by sedimentation velocity experiments and direct fitting of the concentration profiles. *Biophys J* 1997, 72:428-434.

- Behlke J., Ristau O., Sedimentation equilibrium: a valuable tool to study homologous and heterogeneous interactions of proteins or proteins and nucleic acids. *Eur Biophys J* 2003, 32:427-431.
- Bell R.M., Mocanu M.M. *et al.*, Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2011, 50:940-950.
- Berg J.S., Powell B.C. *et al.*, A millennial myosin census. *Mol Biol Cell* 2001, 12:780-794.
- Bers D.M., Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002, 415:198-205.
- Bonne G., Carrier L. *et al.*, Familial hypertrophic cardiomyopathy: from mutations to functional defects. *Circ Res* 1998, 83:580-593.
- Bos J.M., Theis J.L. *et al.*, Relationship between sex, shape, and substrate in hypertrophic cardiomyopathy. *Am Heart J* 2008, 155:1128–1134.
- Bos J.M., Towbin J.A. *et al.*, Diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of genetic testing for hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2009, 54:201–211.
- Bouvagnet P., Leger J. *et al.*, Fiber types and myosin types in human atrial and ventricular myocardium. An anatomical description. *Circ Res* 1984, 55:794-804.
- Brahms S., Brahms J., Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J Mol Biol* 1980, 138:149-178.
- Bresnick A.R., Molecular mechanisms of nonmuscle myosin-II regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1999, 11:26-33.
- Bronson S.K., Plaehn E.G. *et al.*, Single-copy transgenic mice with chosen-site integration. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:9067-9072.
- Brugada R., Kelsey W., *et al.*, Role of candidate modifier genes on the phenotypic expression of hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Invest Med* 1997, 45:542-551.

- Carraro U., Catani C. A sensitive SDS-PAGE method separating myosin heavy chain isoforms of rat skeletal muscles reveals the heterogeneous nature of the embryonic myosin. *Biochem Biophys Res Commun* 1983, 116:793-802.
- Chalovich J.M., Stein L.A. *et al.*, Interaction of isozymes of myosin subfragment 1 with actin: effect of ionic strength and nucleotide. *Biochemistry* 1984, 23:4885-4889.
- Chung M.W., Tsoutsman T. *et al.*, Hypertrophic cardiomyopathy: from gene defect to clinical disease. *Cell Res* 2003, 13: 9-20.
- Coluccio L.M., Myosins: A Superfamily of Molecular Motors. *Proteins and Cell Regulation* 2008, V7.
- Cooke R., The mechanism of muscle contraction. *CRC Crit Rev Biochem* 1986, 21:53-118.
- Craig R., Woodhead J.L., Structure and function of myosin filaments. *Curr Opin Struct Biol* 2006, 16:204-212.
- DiFrancesco D., Noble D., A model of cardiac electrical activity incorporating ionic pumps and concentration changes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1985, 307:353-398.
- Dreizen P., Gershman L.C. *et al.*, Myosin Subunits and their interactions. *J Gen Physiol* 1967, 50:Suppl:85-118.
- Engelhardt V.A., Lyubimova M.N., Myosin and adenosinetriphosphatase. *Nature* 1939, 144:668–669.
- Epstein N.D., The molecular biology and pathophysiology of hypertrophic cardiomyopathy due to mutations in the beta myosin heavy chains and the essential and regulatory light chains. *Adv Exp Med Biol* 1998, 453:105-114.
- Fawcett D.W., McNutt N.S., The ultrastructure of cat myocardium. I. Ventricular papillary muscle. *J Cell Biol* 1969, 42:1-45.
- Ferrantini C., Belus A. *et al.*, Mechanical and energetic consequences of HCM-causing mutations. *J Cardiovasc Transl Res* 2009, 2:441-451.

- Fewell J.G., Hewett T.E. *et al.*, Functional significance of cardiac myosin essential light chain isoform switching in transgenic mice. *J Clin Invest* 1998, 101:2630-2639.
- Feynman R.P., Leighton R.B. *et al.*, The Feynman Lectures on Physics. Addison-Wesley Reading, MA, 1964, Vol. 2.
- Fodor W.L., Darras B. *et al.*, Human ventricular/slow twitch myosin alkali light chain gene characterization, sequence, and chromosomal location. *J Biol Chem* 1989, 264:2143-2149.
- Frank G., Weeds A.G., The amino-acid sequence of the alkali light chains of rabbit skeletal-muscle myosin. *Eur J Biochem* 1974, 44:317-334.
- Gazith J., Himmelfarb S. *et al.*, Studies on the subunit structure of myosin. *J Biol Chem* 1970, 245:15–22.
- Geeves M.A., Holmes K.C., Structural mechanism of muscle contraction. *Annu Rev Biochem* 1999, 68:687-728.
- Geeves M.A., Holmes K.C. The molecular mechanism of muscle contraction. *Adv Protein Chem* 2005, 71:161-193.
- Geisterfer-Lowrance A. A., Christe M. *et al.*, A mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Science* 1996, 272:731-734.
- Gergely J., On the relationship between myosin and ATPase. *Fed. Proc.* 1950, 9:176.
- Gordon A.M. Homsher E. *et al.*, Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev* 2000, 80:853-924.
- Gordon A.M., Regnier *et al.*, Skeletal and cardiac muscle contractile activation: tropomyosin "rocks and rolls". *News Physiol Sci* 2001, 16:49-55.
- Gorza L., Mercadier J.J. *et al.*, Myosin types in the human heart. An immunofluorescence study of normal and hypertrophied atrial and ventricular myocardium. *Circ Res* 1984, 54:694-702.
- Gregorio C.C., Antin P.B., To the heart of myofibril assembly. *Trends Cell Biol* 2000, 10:355-362.

- Hernandez O.M., Szczesna-Cordary D. *et al.*, F110I and R278C troponin T mutations that cause familial hypertrophic cardiomyopathy affect muscle contraction in transgenic mice and reconstituted human cardiac fibers. *J Biol Chem* 2005, 280:37183–37194.
- Hernandez O.M., Jones M. *et al.*, Myosin essential light chain in health and disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007, 292:H1643-1654.
- Holmes K.C. The swinging lever-arm hypothesis of muscle contraction. *Curr Biol* 1997, 7:R112-118.
- Holmes K.C., Popp D. *et al.*, Atomic model of the actin filament. *Nature* 1990, 347:44-49
- Houdusse A., Cohen, C., Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2 Å resolution: implications for regulation. *Structure* 1996, 4:21-32.
- Houdusse A., Szent-Gyorgyi A.G. *et al.*, Three conformational states of scallop myosin S1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:11238-11243.
- Howard J., Spudich J.A., Is the lever arm of myosin a molecular elastic element? *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:4462-4464.
- Hughes S.E., McKenna W.J., New insights into the pathology of inherited cardiomyopathy, *Heart* 2005, 91:257-264.
- Huxley A.F., Muscle structure and theories of contraction. *Prog Biophys Biophys Chem.* 1957, 7:255-318.
- Huxley H.E., Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle. *J Mol Biol* 1963, 7:281–308.
- Irving M., St Claire Allen T. *et al.*, Tilting of the light-chain region of myosin during step length changes and active force generation in skeletal muscle. *Nature* 1995, 375:688-691.
- Jaenicke T., Diederich K.W. *et al.*, The complete sequence of the human beta-myosin heavy chain gene and a comparative analysis of its product. *Genomics* 1990, 8:194-206.



- James J., Osinska H. *et al.*, Transgenic over-expression of a motor protein at high levels results in severe cardiac pathology. *Transgenic Res* 1999, 8:9-22.
- James J., Zhang Y. *et al.*, Transgenic rabbits expressing mutant essential light chain do not develop hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2002, 34:873-882.
- Kahn M.M., Komiyama M., The second EF-hand Is Responsible for the Isoform-specific Sorting of Myosin Essential Light Chain. *Cell Structure and Function* 2001, 26:243-251.
- Kaski J.P., Syrris P. *et al.*, Prevalence of sarcomere protein gene mutations in preadolescent children with hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet* 2009, 2:436-441.
- Kazmierczak K., Xu Y. *et al.*, The role of the N-terminus of the myosin essential light chain in cardiac muscle contraction. *J Mol Biol* 2009, 387:706-725.
- Keller D.I., Coirault C. *et al.*, Human homozygous R403W mutant cardiac myosin presents disproportionate enhancement of mechanical and enzymatic properties. *J Mol Cell Cardiol* 2004, 36:355-362.
- Kelly S.M., Jess T.J. *et al.*, How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta* 2005, 1751:119-139.
- Kominz D.R., Carroll W.R. *et al.*, A subunit of myosin. *Arch Biochem Biophys* 1959, 79:191-199.
- Kominz D.R., Mitchell E.R. *et al.*, The papain digestion of skeletal myosin A. *Biochemistry* 1965, 4:2373-2382.
- Komiyama M., Khan M.M. *et al.*, Fast skeletal muscle isoforms exhibit the highest incorporation level into myofibrils and stress fibers among members of myosin alkali light chain isoform family. *Cell Struct Funct* 2000, 25:141-148.
- Konno T., Chang S. *et al.*, Genetics of hypertrophic cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol* 2011, published online 2010.
- Kott M., Haberland, A. *et al.*, A new efficient method for transfection of neonatal cardiomyocytes using histone H1 in combination with DOSPER liposomal transfection reagent. *Somat Cell Mol Genet* 1998, 24:257-261.

- Krendel M., Mooseker M.S., Myosins: tails (and heads) of functional diversity. *Physiology (Bethesda)* 2005, 20:239-251.
- Krenz M. and Robbins J., Impact of beta-myosin heavy chain expression on cardiac function during stress. *J Am Coll Cardiol* 2004, 44:2390-2397.
- Kühne W., Untersuchungen über das Protoplasma und die Contractilität. W. Engelmann, 1864, Leipzig.
- Kurabayashi M., Komuro I. *et al.*, Molecular cloning and characterization of human atrial and ventricular myosin alkali light chain cDNA clones. *J Biol Chem* 1988, 263:13930-13936.
- Lakowicz J.R., Principles of frequency-domain fluorescence spectroscopy and applications to cell membranes. *Subcell Biochem* 1988, 13:89-126.
- Langendorff O., Untersuchungen am überlebenden Säugtierherzen. *Pflu(Ü)gers Arch* 1895; 61:291-332
- Lee W., Hwang T.H. *et al.*, Different expressivity of a ventricular essential myosin light chain gene Ala57Gly mutation in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Am Heart J* 2001, 141:184-189.
- Locker R.H., The dissociation of myosin by heat coagulation. *Biochim Biophys Acta* 1956, 20:514-521.
- Lombardi V., Piazzesi, G. *et al.*, Elastic distortion of myosin heads and repriming of the working stroke in muscle. *Nature* 1995, 374:553-555.
- Lossie J., Ushakov D.S. *et al.*, Mutations of ventricular essential myosin light chain disturb myosin binding and sarcomeric sorting. *Cardiovasc Res* 2011, Advance Access published online November 30, 2011
- Lowes B.D., Minobe W. *et al.*, Changes in gene expression in the intact human heart: Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *J Clin Invest* 1997, 100:2315-2324.
- Lowey S., Goldstein L. *et al.*, Proteolytic degradation of myosin and the meromyosins by a water-insoluble polyanionic derivative of trypsin. *J. Mol. Biol* 1967, 23:287-304.

- Lowey S., Slayter H.S. *et al.*, Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. J. Mol. Biol 1969, 42:1–29.
- Lowey S., Risby D. *et al.*, Light chains from fast and slow muscle myosins. Nature 1971, 234:81–85.
- Lowey S., Waller G.S. *et al.*, Skeletal muscle myosin light chains are essential for physiological speeds of shortening. Nature 1993, 365:454–456.
- Lymn R.W., Taylor E.W., Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. Biochemistry 1971, 10:4617–4624.
- Maravillas-Montero J.L., Santos-Argumedo L., The myosin family: unconventional roles of actin-dependent molecular motors in immune cells. J Leukoc Biol 2011 Sep 30. [Epub ahead of print]
- Marian A.J., Roberts R., Molecular genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy: genetic markers for sudden cardiac death. J Cardiovasc Electrophysiol 1998, 9:88–99.
- Maron B.J., Epstein S.E. *et al.*, Hypertrophic cardiomyopathy: a common cause of sudden death in young competitive athlete, Eur Heart J 1983, 4(suppl F):135–144.
- Maron B.J., Gardin J.M. *et al.*, Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults. Circulation 1995, 92:785–789.
- Maron B.J., Hypertrophic cardiomyopathy. Lancet 1997, 350:127–133.
- Maron B.J., McKenna W.J. *et al.*, American College of Cardiology/European Society of Cardiology clinical expert consensus document on hypertrophic cardiomyopathy. A report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines. J Am Coll Cardiol 2003a, 42:1687–1713.
- Maron B.J., Sudden death in young athletes. N Engl J Med 2003b, 349:1064–1075.

- Marston S., Copeland O. *et al.*, Evidence from human myectomy samples that MYBPC3 mutations cause hypertrophic cardiomyopathy through haploinsufficiency. *Circ Res* 2009, 105:219–222.
- Mathern B.E., Burke M., Stability and substructure of cardiac myosin subfragment 1 and isolation and properties of its heavy-chain subunit. *Biochemistry* 1986, 25:884-889.
- Matsuoka R., Beisel K.W. *et al.*, Complete sequence of human cardiac alpha-myosin heavy chain gene and amino acid comparison to other myosins based on structural and functional differences. *Am J Med Genet* 1991, 41:537-547.
- Meder B., Laufer C. *et al.*, A single serine in the carboxyl terminus of cardiac essential myosin light chain-1 controls cardiomyocyte contractility in vivo. *Circ Res* 2009, 104:650-659.
- Mettikolla P., Calander N. *et al.*, Cross-bridge kinetics in myofibrils containing familial hypertrophic cardiomyopathy R58Q mutation in the regulatory light chain of myosin. *J Theor Biol* 2011, 284:71-81.
- Mihályi E., Szent-Györgyi A.G., Trypsin digestion of muscle proteins. *J. Biol. Chem* 1953, III:211–219.
- Mitchell G.A.G., The innervation of the heart. *Br Heart J* 1953, 15, 159-171.
- Miyata S., Minobe W. *et al.*, Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart. *Circ Res.* 2000, 86:386–90.
- Mohiddin S.A., Begley D.A. *et al.*, Utility of genetic screening in hypertrophic cardiomyopathy: prevalence and significance of novel and double (homozygous and heterozygous) beta-myosin mutations. *Genet Test* 2003, 7:21-27.
- Moore J.R., Dickibnson M.H. *et al.*, The effect of removing the N-terminal extension of the *Drosophila* myosin regulatory light chain upon flight ability and the contractile dynamics of indirect flight muscle. *Biophys. J* 2000, 78:1431–1440.
- Moncrief N.D., Kretsinger R.H. *et al.*, Evolution of EF-hand calcium-modulated proteins: Relationships based on amino acid sequences. *J Mol Evol* 1990, 30:522-562.

- Morano I., Ritter, O. *et al.*, Myosin light chain-actin interaction regulates cardiac contractility. *Circ Res* 1995, 76:720-725.
- Morano M., Zacharzowski U. *et al.*, Regulation of human heart contractility by essential myosin light chain isoforms. *J Clin Invest* 1996, 98:467-473.
- Morano I., Haase, H. Different actin affinities of human cardiac essential myosin light chain isoforms. *FEBS Lett* 1997, 408:71-74.
- Morano I., Tuning the human heart molecular motors by myosin light chains. *J Mol Med (Berl)* 1999, 77:544-555.
- Morita H., Rehm H.L. *et al.*, Shared genetic causes of cardiac hypertrophy in children and adults. *N Engl J Med* 2008, 358:1899–1908.
- Muthu P., Wang L. *et al.*, Structural and functional aspects of the myosin essential light chain in cardiac muscle contraction. *Faseb J.* 2011, Epub ahead of print
- Nabeshima Y., Fujii-Kuriyama Y. *et al.*, Alternative transcription and two modes of splicing results in two myosin light chains from one gene. *Nature* 1984, 308:333-338.
- Olson T.M., Karst M.L. *et al.*, Myosin light chain mutation causes autosomal recessive cardiomyopathy with mid-cavitary hypertrophy and restrictive physiology. *Circulation* 2002, 105:2337-2340.
- Palmiter K.A., Tyska M. J. *et al.*, R403Q and L908V mutant beta-cardiac myosin from patients with familial hypertrophic cardiomyopathy exhibit enhanced mechanical performance at the single molecule level. *J Muscle Res Cell Motil* 2000, 21:609-620.
- Parry D.A., Squire, J. M., Structural role of tropomyosin in muscle regulation: analysis of the x-ray diffraction patterns from relaxed and contracting muscles. *J Mol Biol* 1973, 75:33-55.
- Periasamy M., Strehler E.E. *et al.*, Fast skeletal muscle myosin light chains 1 and 3 are produced from a single gene by a combined process of differential RNA transcription and splicing. *J Biol Chem* 1984, 259:13595-13604.
- Perkins M.J., Van Driest S.L. *et al.*, Gene-specific modifying effects of pro-LVH polymorphisms involving the renin-angiotensin-aldosterone system among 389 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2005, 26:2457–2462.

- Perrie W.T., Smillie L.B. *et al.*, A phosphorylated light-chain component of myosin. *Biochem J* 1972, 128:105P-106P.
- Perry S.V., The adenosinetriphosphatase activity of myofibrils isolated from skeletal muscle. *Biochem. J* 1951, 48:257–265.
- Petzhold D., Lossie J. *et al.*, Auto-inhibitory effects of an IQ motif on protein structure and function. *Biochem Biophys Res Commun* 2010, 396:939-943.
- Petzhold D., Lossie J. *et al.*, Human essential myosin light chain isoforms revealed distinct myosin binding, sarcomeric sorting, and inotropic activity. *Cardiovasc Res* 2011, 90:513-520.
- Poetter K., Jiang, H. *et al.*, Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle. *Nat Genet* 1996, 13: 63-69.
- Rarick H.M., Opgenorth T.J. *et al.*, An essential myosin light chain peptide induces supramaximal stimulation of cardiac myofibrillar ATPase activity. *J Biol Chem* 1996, 271:27039-27043.
- Rayment I., Rypniewski W.R. *et al.*, Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* 1993, 261:50-58.
- Rehm H., *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 4. Auflage 2002.
- Richard P., Charron P. *et al.*, Hypertrophic Cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation* 2003, 107:2227-2232.
- Ritter O., Luther H.P. *et al.*, Expression of atrial myosin light chains but not alpha-myosin heavy chains is correlated in vivo with increased ventricular function in patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *J Mol Med* 1999, 77:677-685.
- Robbins J., Remodeling the cardiac sarcomere using transgenesis. *Annu Rev Physiol* 2000, 62:261-87.
- Rubart M., Zipes D.P., Mechanisms of sudden cardiac death. *J Clin Invest* 2005, 115:2305-2315.

- Saez L.J., Gianola K.M. *et al.*, Human cardiac myosin heavy chain genes and their linkage in the genome. *Nucleic Acids Res* 1987, 15:5443-5459.
- Sanbe A., Nelson D. *et al.*, In vivo analysis of an essential myosin light chain mutation linked to familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res* 2000, 87:296-302.
- Sarkar S., Sreter F.A. *et al.*, Light chains of myosins from white, red, and cardiac muscles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971, 68:946-950.
- Schaub M.C., Hefti M.A. *et al.*, Modulation of contractility in human cardiac hypertrophy by myosin essential light chain isoforms. *Cardiovasc Res* 1998, 37:381-404.
- Schiaffino S., Reggiani C., Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev* 1996, 76:371-423.
- Seidman J.G., Seidman C., The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell* 2001, 104:557-567.
- Siebert R., Perrot A. *et al.*, A myomesin mutation associated with hypertrophic cardiomyopathy deteriorates dimerisation properties. *BBRC* 2011, 405:473-479.
- Sivaramakrishnan M., Burke M., The free heavy chain of vertebrate skeletal myosin subfragment 1 shows full enzymatic activity. *J Biol Chem* 1982, 257:1102-1105.
- Skrzypiec-Spring M., Grotthus B. *et al.*, Isolated heart perfusion according to Langendorff---still viable in the new millennium. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2007, 55:113-126.
- Slayter H.S., Lowey S., Substructure of the myosin molecule as visualized by electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1967, 58:1611-1618.
- Solaro R.J., Pang D.C. *et al.*, The purification of cardiac myofibrils with Triton X-100. *Biochim Biophys Acta* 1971, 245:259-262.
- Solaro R.J., Van Eyk J., Altered interactions among thin filament proteins modulate cardiac function. *J Mol Cell Cardiol* 1996, 28:217-230.

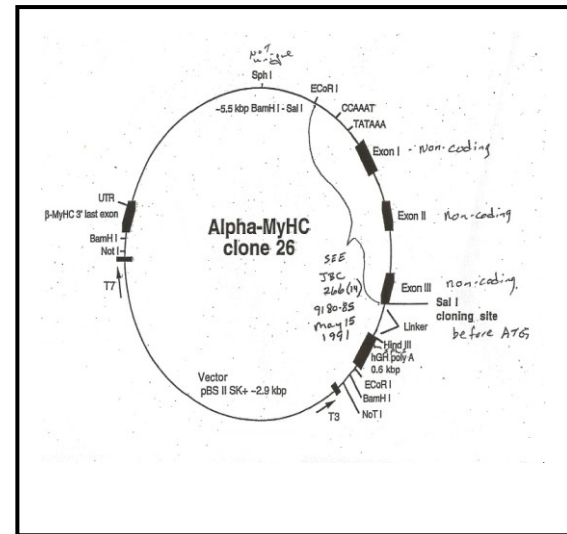
- Spirito P., Maron B.J. Sudden death and hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet* 2001, 357:1975-1976.
- Spudich J.A., Huxley H.E. *et al.*, Regulation of skeletal muscle contraction. II. Structural studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin. *J Mol Biol* 1972, 72:619-632.
- Spudich J.A., Finer J. *et al.*, Myosin structure and function. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1995, 60:783-91.
- Stepkowski D., Szczesna D. *et al.*, Significance of the N-terminal fragment of myosin regulatory light chain for myosin-actin interaction. *Biochem Mol Biol Int* 1995, 35:677-684.
- Stracher A. Evidence for the involvement of light chains in the biological functioning of myosin. *Biochem. Biophys Res Commun* 1969, 35:519–525.
- Straub F.B., Actin II. *Stud Inst Med Chem Univ Szeged* 1943, III:23–37.
- Suhling K., French P.M. *et al.*, Time-resolved fluorescence microscopy. *Photochem Photobiol Sci* 2005, 4:13-22.
- Sutoh K., Identification of myosin-binding sites on the actin sequence. *Biochemistry* 1982, 21:3654-3661.
- Sweeney H.L., Function of the N terminus of the myosin essential light chain of vertebrate striated muscle. *Biophys J* 1995, 68:112S-118S; discussion 118S-119S.
- Szent-Györgyi A.G., Meromyosins, the subunits of myosin. *Arch. Biochem. Biophys* 1953, 42:305–320.
- Tardiff J.C., Sarcomeric proteins and familial hypertrophic cardiomyopathy: linking mutations in structural proteins to complex cardiovascular phenotypes. *Heart Fail Rev* 2005, 10:237-248.
- Timson D.J., Trayer H.R. *et al.*, The N-terminus of A1-type myosin essential light chains binds actin and modulates myosin motor function. *Eur J Biochem* 1998, 255:654-662.



- Thompson R.F., Langford G.M., Myosin superfamily evolutionary history. *Anat Rec* 2002, 268, 276-289.
- Trayer I.P., Trayer H.R. *et al.*, Evidence that the N-terminal region of A1-light chain of myosin interacts directly with the C-terminal region of actin. A proton magnetic resonance study. *Eur J Biochem* 1987, 164:259-266.
- Tripathi S., Schultz I. *et al.*, Unequal allelic expression of wild-type and mutated beta-myosin in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol.* 2011, Epub ahead of print.
- Tsao T.C., Fragmentation of the myosin molecule. *Biochim Biophys Acta* 1953, 11:368-382.
- Tyska M. J., Hayes E. *et al.*, Single-molecule mechanics of R403Q cardiac myosin isolated from the mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res* 2000, 86:737-744.
- Ushakov D.S., Caorsi V. *et al.*, Response of rigor cross-bridges to stretch detected by fluorescence lifetime imaging microscopy of myosin essential light chain in skeletal muscle fibers. *J Biol Chem* 2011, 286:842-850.
- Uyeda T.Q., Abramson P.D. *et al.*, The neck region of the myosin motor domain acts as a lever arm to generate movement. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:4459-4464.
- VanBuren P., Waller G.S. *et al.*, The essential light chain is required for full force production by skeletal muscle myosin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91:12403-12407.
- van Dijk S.J., Dooijes D. *et al.*, Cardiac myosin-binding protein C mutations and hypertrophic cardiomyopathy: haploinsufficiency, deranged phosphorylation, and cardiomyocyte dysfunction. *Circulation* 2009, 119:1473–1483.
- Vemuri R., Lankford E.B. *et al.*, The stretch-activation response may be critical to the proper functioning of the mammalian heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96:1048-1053.
- Volkman N., Lui H. *et al.*, The R403Q myosin mutation implicated in familial hypertrophic cardiomyopathy causes disorder at the actomyosin interface. *PLoS One* 2007, 2:e1123.

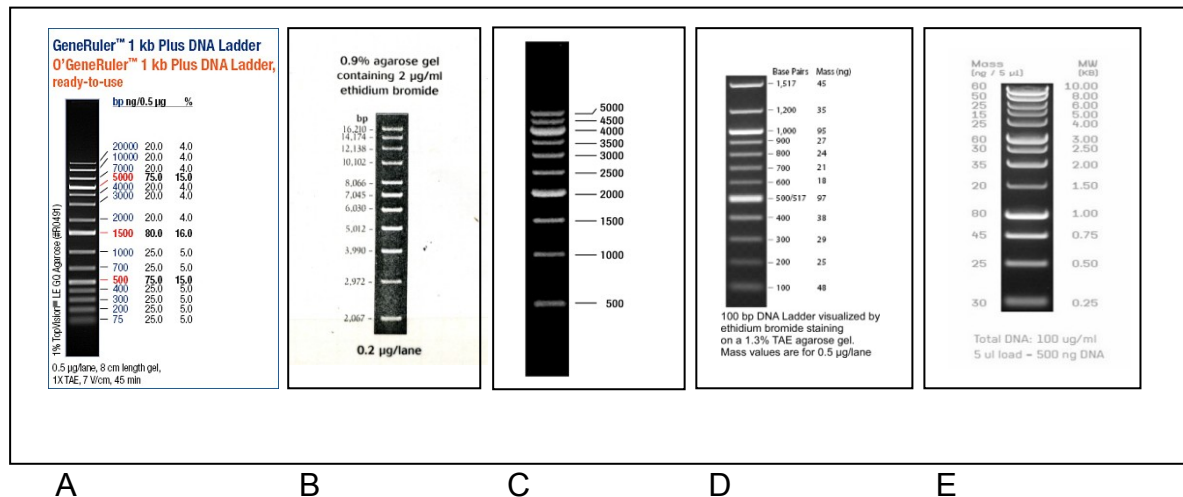
- Wagner P.D., Giniger E., Hydrolysis of ATP and reversible binding to F-actin by myosin heavy chains free of all light chains. *Nature* 1981, 292:560-562.
- Weber H.H. Der Feinbau und die mechanischen Eigenschaften des Myosin-fadens. *Arch. Physiol.* 1935, 235:205–233.
- Weeds A.G. and Lowey S., The substructure of the myosin molecule II. The light chains of myosin. *J Mol Biol* 1971, 61:701–725.
- Weeds A.G., Frank G., Structural studies on the light chains of myosin. *The Mechanism of Muscle Contraction. Cold spring Harbor Symposia on quantitative Biology, Vol. XXXVII (1972), pp 9-14.*
- Weeds A.G., Tayler R.S., Separation of subfragment-1 isoenzymes from rabbit skeletal muscle myosin. *Nature (London)* 1975, 257:54-56.
- Wendel B., Reinhard R. *et al.*, The human beta-myosin heavy chain gene: sequence diversity and functional characteristics of the protein. *J Cell Biochem* 2000, 79:566-575.
- Winegrad S., Cardiac myosin binding protein C. *Circ Res* 1999, 84:1117-1126.
- Zaager S., Burke, M., Subunit interactions of skeletal muscle myosin and myosin subfragment 1. Evidence for heavy chain-alkali light chain association-dissociation equilibrium. *J Biol Chem* 1988, 263:1513-1517.



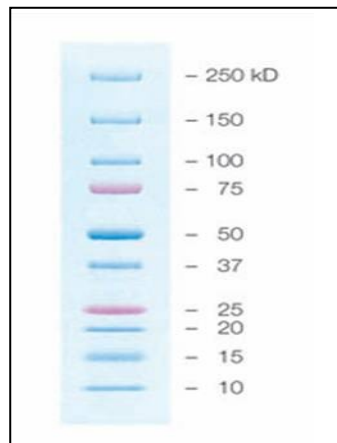


**Abb. 49: Vektor pBS II SK+ mit  $\alpha$ -MyHC-Promoter der Maus.** von Dr. J. Robins, OH, USA  
Cincinnati Children's Hospital Medical Center,

## 6.2 Marker



114



**Abb. 51: Verwendeter Proteinmarker.** Precision Plus Protein Standards Dual Color, Bio-Rad, München

### 6.3 Nukleotid- und Proteinsequenzen

#### Nukleotidsequenz von hVLC1

>gi|115527085|ref|NM\_000258.2| Homo sapiens myosin, light chain 3, alkali; ventricular, skeletal, slow (MYL3), mRNA

```
ATCCGGGCAGGATAAAGGCCTGGGTGAGGCGGCTCACCTACCCTGCTTTCTGCATTCTTCTCTC
CACATCCCTCTCTGTACTTACAGCCCCCAATGGCCCCCAAAAAGCCAGAGCCCAAGAAGGATGAT
GCCAAGGCAGCCCCCAAGGCAGCTCCAGCTCCCGCACCTCCCCCTGAGCCTGAGCGCCCTAAG
GAGGTCGAGTTTGTATGCTTCCAAGATCAAGATTGAGTTCACACCTGAGCAGATTGAAGAGTTCAA
GGAAGCCTTCATGCTGTTTCGACCGCACACCCCAAGTGTGAGATGAAGATCACCTACGGGCAGTGT
GGGGATGTCCTGCGGGCGCTGGGCCAGAACCCACACAGGCAGAAGTGCTCCGTGTCCTGGGG
AAGCCAAGACAGGAAGAGCTCAATACCAAGATGATGGACTTTGAAACTTTCCTGCCTATGCTCCA
GCACATTTCCAAGAACAAGGACACAGGCACCTATGAGGACTTCGTGGAGGGGCTGCGGGTCTTC
GACAAGGAGGGCAATGGCACTGTCATGGGTGCTGAGCTTCGCCACGTGCTGGCCACGCTGGGT
GAGAGGCTGACAGAAGACGAAGTGGAGAAGTTGATGGCTGGGCAAGAGGACTCCAATGGCTGC
ATCAACTATGAAGCATTTGTGAAGCACATCATGTCCAGCTAAACCTCGTGCCAGGAAGCCCAGG
GAAGGCTGTGCAGGGACGTCTCATCTCCCATGTGTGATGCTGACACCAGCGGCCTGGAGTCGTG
GGAAGGAGGGGAGCCTTACCAAGACTCCTGCAAAAACCCTTGGACCTCTCCACGTGGTTGCCGT
CTCTGGCCCCTCTCAGGCTGTGCTTACCTGTGACAGCAGCTCTGTCCCCACCCCATGGGCCTCA
TGAATAAATGGCTTCTTGCCGGCCTTCCTTTCTAAAAAAAAAAAAA
```

#### Proteinsequenz von hVLC1

>gi|4557777|ref|NP\_000249.1| myosin light chain 3 [Homo sapiens]

```
MAPKKPEPKKDDAKAAPKAAPAPAPPPPEPERPKEVEFDASKIKIEFTPEQIEEFKEAFMLFDRTPKCEM
KITYGQCGDVLRALGQNPTQAEVLRVLGKPRQEELNTKMMDFETFLPMLQHISKNKDTGTIEDFVEG
LRVFDKEGNGTVMGAELRHVLATLGERLTEDEVEKLMAGQEDSNGCINYEAFVKHIMSS
```

### Proteinsequenz von mVLC1

>gi|33563264|ref|NP\_034989.1| myosin light chain 3 [Mus musculus]

MAPKKPEPKKDDAKAAAPKAAPAPAAAPAAAPAAPEPERPKAEFDASKIKIEFTPEQIEEFKEAFL  
FDRTPKGEMKITYGQCGDVLRALGQNPTQAEVLRVLGKPKQEELNSKMMDFETFLPMLQHISKNKDT  
GTIEDFVEGLRVFDKEGNGTVMGAELRHVLA TLGERLTEDEVEKLMAGQEDSNGCINYEAFVKHIMA  
S

### Nukleotidsequenz von r $\beta$ -MyHC siehe NCBI

>gi|8393806|ref|NM\_017240.1| Rattus norvegicus myosin, heavy chain 7, cardiac muscle, beta (Myh7), mRNA

### Proteinsequenz von r $\beta$ -MyHC Aminosäuren 664 – 915 (Exprimierter Bereich)

>gi|8393807:664-915 myosin-7 [Rattus norvegicus]

STHPHFVRCIIPNETKSPGVMDNPLVMHQLRCNGVLEGIRICRKGFNRLYGDFRQRYRILNPAAIPE  
GQFIDSRKGAEKLLGSLDIDHNQYKFGHTKVFFKAGLLGLEEMRDERLSRIITRI**IAQSRGVL**SRMEF  
KKLLERRDSSLIIQWNIRAFMGVKNWPWMKLYFKIKPLLKSAETEKEMANMKEEFGRVKDALEKSEAR  
RKELEEKMVSLQEKNDLQLQVQAEQDNLADAEERCDQLIKNKIQL

**fett/unterstrichen** = IQ1 (IQxxxRGxxxR)

### Proteinsequenz der humanen MyHC Aminosäuren 664 – 915

>gi|83304912:664-915 Full=Myosin heavy chain, cardiac muscle beta isoform;  
Short=MyHC-beta

STHPHFVRCIIPNETKSPGVMDNPLVMHQLRCNGVLEGIRICRKGFNRLYGDFRQRYRILNPAAIPE  
GQFIDSRKGAEKLLSSLDIDHNQYKFGHTKVFFKAGLLGLEEMRDERLSRIITRI**IAQSRGVL**LARMEY  
KKLLERRDSSLVIQWNIRAFMGVKNWPWMKLYFKIKPLLKSAEREKEMASMKEEFTRLKEALEKSEAR  
RKELEEKMVSLQEKNDLQLQVQAEQDNLADAEERCDQLIKNKIQL

**fett/unterstrichen** = IQ1 (IQxxxRGxxxR)

## 6.4 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Schematische Darstellung der Hauptbestandteile des Sarkomers von Kardiomyozyten.
- Abb. 2: Schematische Darstellung des Typ II Myosin Hexamers.
- Abb. 3: Kristallstruktur des Myosinkopfes und der Halsregion mit den essentiellen leichten Myosinketten (ELC, kurze Isoform) und den regulatorischen leichten Myosinketten (RLC).

- Abb. 4: Schematische Darstellung des Kalziumtransportes in einer Kardiomyozyte nach einem AP.
- Abb. 5: Lymn-Taylor-Zyklus (A) und Hebelarmbewegung (B).
- Abb. 6: Normales und hypertrophiertes Herz.
- Abb. 7: Darstellung der N-terminalen 46 Aminosäuren der langen ELC Isoform im 3D-Modell.
- Abb. 8: 3-Dimensionale Lokalisation der untersuchten HCM-Mutationen der essentiellen leichten Myosinkette.
- Abb. 9: Schematische Darstellung des MYL3 Gens (oben) bzw. des hVLC1 Proteins (unten) mit den fünf Mutationen E56G, A57G, E143K, M149V und R154H.
- Abb. 10: Darstellung des Sensorchips im Biacore-System und eines schematischen Sensogramms der SPR.
- Abb. 11: Schematische Darstellung des Konstrukts zu Generierung der transgenen Mauslinien.
- Abb. 12: Amplifikationsdiagramm einer qRT-PCR.
- Abb. 13: Lichtmikroskopische Aufnahme einer adulten Kardiomyozyte (40-fach vergrößert).
- Abb. 14: Langendorff Apparatur mit retrograd perfundiertem Mäuseherz.
- Abb. 15: 0,8%iges Agarose-Gel mit PCR-Produkt hVLC1.
- Abb. 16: 0,8 %iges Agarosegel mit Restriktionsverdau (*HindIII*) von hVLC1 im pCR2.1 Vektor.
- Abb. 17: 0,8 %iges Agarosegel mit Restriktionsverdau (*HindIII*) von hVLC1 im pRSETA Vektor.
- Abb. 18: 0,8 %iges Agarosegel mit Restriktionsverdau (*XhoI*) von r $\beta$ -MyHC im pCR2.1 Vektor.
- Abb. 19: 0,8 %iges Agarosegel mit Restriktionsverdau (*XhoI*) von r $\beta$ -MyHC im pGEX-4T1 Vektor.
- Abb. 20: 12 %iges SDS-Gel mit aufgereinigten hVLC1 Proteinen mit Coomassie Blau Färbung.
- Abb. 21: 12 %iges SDS-Gel mit r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup> Fusionsprotein (Coomassie Blau Färbung) und Precision Plus Protein Standards Dual Color Marker.

- Abb. 22: Westernblot von hVLC1 normale und mutierte Formen und r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup> mit anti-HIS- bzw. anti-GST-Antikörpern.
- Abb. 23: Schema des exprimierten Hebelarmbereiches basierend auf bekannten 3D-Strukturen modelliert nach den Daten der analytischen Ultrazentrifugation.
- Abb. 24: Sedimentations-Equilibrium-Zentrifugation von r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub> und r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub>IQ2<sup>ala4</sup> (1.0–6.5  $\mu$ M).
- Abb. 25: Sekundärstruktur- und Thermostabilitäts-Untersuchung von hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> mittels CD-Spektrum und Schmelzkurve.
- Abb. 26: Exemplarisches Oberflächen-Plasmon-Resonanz Sensorgramm und K<sub>D</sub>-Werte.
- Abb. 27: Coumarin Fluoreszenz Analyse eines 8 %iges SDS-Gel von einem Muskelfaserextrakt.
- Abb. 28: Fluoreszenzlebensdauer-Profil von hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup>.
- Abb. 29: Fluoreszenzlebensdauer von hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> in M. Psoas oder M. Soleus (Relaxlösung).
- Abb. 30: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie - Einbau der essentiellen leichten Myosinketten hVLC1 bzw. hVLC1<sup>E56G</sup> in neonatale Rattenkardiomyozyten 18 h nach Einzeltransfektion mit Lipofectamin.
- Abb. 31: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie – Koexpression der leichten Myosinketten hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> in neonatale Rattenkardiomyozyten 18 h nach Transfektion mit Lipofectamin.
- Abb. 32: Verteilung von hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> in den 264 kotransfizierten neonatalen Rattenkardiomyozyten.
- Abb. 33: Genotypisierung der transgenen Mauslinien 0,8 %iges Agarosegel.
- Abb. 34: Standardkurven von hVLC1 und 18S-rRNA über die anschließend mittels des C<sub>t</sub>-Wertes die mRNA Level bestimmt wurden.
- Abb. 35: Semiquantitative Analyse mittels qRT-PCR der mRNA Expression von hVLC1, hVLC1<sup>E56G</sup> und 18S-rRNA im Herzen der transgenen Mäuse normiert auf den Standard 18S.
- Abb. 36: Expression und Substitution von hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> in transgenen Tierlinien- und C57/BL6 Kontrolltier.
- Abb. 37: Alpha- und beta-Myosinverteilung im Herzen der TGM-Linien.
- Abb. 38: Echokardiographie M (*motion*)-Mode Bilder aus der kurzen Achse (parasternal) zweier transgener Mäuseherzen.



- Abb. 39: Exemplarische Darstellung der Zellverkürzungsmessung an einer isolierten Mauskardiomyozyte.
- Abb. 40: Graphische Darstellung der Zell-Verkürzungsparameter von isolierten hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> Mauskardiomyozyten.
- Abb. 41: Originalregistrierung eines Langendorff Versuches.
- Abb. 42: Kontraktionseigenschaften der transgenen Mauslinien im Langendorff Versuch.
- Abb. 43: Sequenzvergleich von ELC-Isoformen in verschiedenen Spezies im Bereich der konservierten E56 Aminosäure (rot markiert).
- Abb. 44: Vektor pCR2.1.
- Abb. 45: Vektor pRSET A.
- Abb. 46: Vektor pET-28a(+).
- Abb. 47: Vektor pGEX-4T-1.
- Abb. 48: Vektor pcDNA3.1+.
- Abb. 49: Vektor pBS II SK+ mit  $\alpha$ -MyHC-Promoter der Maus.
- Abb. 50: Verwendete DNA Marker.
- Abb. 51: Verwendeter Proteinmarker.

## 6.5 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: In der PCR eingesetzte Oligonukleotidprimer.
- Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete Antikörper.
- Tab. 3: Endkonzentration der in der PCR eingesetzten Substanzen pro Probe und Cyclerprogramm.
- Tab. 4: Zusammensetzung eines 12%igen Trenngels mit 5%igem Sammelgel für die SDS-Page.
- Tab. 5: Mastermix für den PCR-Ansatz der reversen Transkription und verwendetes Cyclerprogramm.
- Tab. 6: Reaktionsansatz für die quantitative Echtzeit PCR und verwendetes Cyclerprogramm.

- Tab. 7: Resultate der Sedimentations-Geschwindigkeits-Zentrifugation von r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub> und r $\beta$ -MyHC<sub>664-915</sub>IQ<sup>ala4</sup>.
- Tab. 8: Aus dem CD-Spektrum errechneten prozentualen Anteile von  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und *random-coil*-Strukturen in den rekombinanten hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> Proteinen.
- Tab. 9: Oberflächen-Plasmon-Resonanz Ergebnisse  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  und  $K_D$  der verschiedenen hVLC/MyHC-Komplexe.
- Tab. 10: Morphologische Daten der Echokardiographie von TGM/hVLC1 und TGM/hVLC1<sup>E56G</sup> Mäusen.
- Tab. 11: Zellverkürzungsmessungen von hVLC1, hVLC1<sup>E56G</sup> und C57/BL6 an transgenen isolierten Kardiomyozyten.
- Tab. 12: Ergebnisse der Langendorff-Versuche mit transgenen hVLC1 und hVLC1<sup>E56G</sup> Mäusen.

## Danksagung

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. Ingo Morano für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Unterstützung und die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe danken.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Höhne von der Humboldt-Universität zu Berlin danke ich für die offizielle Betreuung meiner Arbeit.

Besonders herzlicher Dank geht an alle meine Kollegen für die freundliche Aufnahme, die fachliche Unterstützung und die allgemeine Hilfsbereitschaft. Danke auch für die vielen fröhlichen Stunden im Labor und die Einführung in den „Bandentanz“ und das „Laborvoodoo“. Besonderer Dank geht dabei an Dr. Daria Petzhold für die tatkräftige Hilfe beim Start in die Arbeit sowie Dr. Christiane Look für die interessanten Diskussionen bei vegetarischem Sushi.

Bei allen unseren technischen Assistenten, im Besonderen bei Petra Sakel und Petra Domaing, möchte ich mich für Ihre kompetente und tatkräftige Unterstützung bedanken.

Ausdrücklich möchte ich mich auch bei meinen Freunden für das entgegengebrachte Verständnis meiner wirren Zeitpläne und nächtlichen emails bedanken. Außerdem für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft und all das Zuhören, Motivieren, Ablenken und "gut zureden". Und nicht zu vergessen: „...they're laboratory mice, their genes have been spliced, they're dinky, they're Pinky and the Brain, Brain, Brain, Brain...“.

Und ein ganz besonders großes Dankeschön geht an meine Familie, ohne die das Alles in dieser Form nicht möglich gewesen wäre, für ihren fortwährenden Beistand in allen Höhen und Tiefen der letzten Doktorandenjahre.

## Publikationen

Lossie J., Ushakov D.S. *et al.* Mutations of ventricular essential myosin light chain disturb myosin binding and sarcomeric sorting. *Cardiovasc Res* 2011, Advance Access published online November 30, 2011

Petzhold D., Lossie J. *et al.*, Human essential myosin light chain isoforms revealed distinct myosin binding, sarcomeric sorting, and inotropic activity. *Cardiovasc Res* 2011, 90:513-520.

Petzhold D., Lossie J. *et al.*, Auto-inhibitory effects of an IQ motif on protein structure and function. *Biochem Biophys Res Commun* 2010, 396:939-943.

## Kongressbeiträge

Lossie J. *et al.*, Mutation of ventricular essential myosin light chain disturb myosin binding und sarcomeric sorting. Evaluation MDC: Cardiovascular and Metabolic Disease AG Morano, March 2012, MDC Berlin-Buch (Poster presentation by group member and additional discussions)

Lossie J. *et al.*, Mutations of ventricular essential myosin light chain disturb myosin binding and sarcomeric sorting. 40<sup>th</sup> European Muscle Conference 2011, MDC Berlin-Buch Deutschland (Poster).

Lossie J. *et al.*, Mutations in the human ventricular essential myosin light chain gene. 39<sup>th</sup> European Muscle Conference 2010, Padua Italien (Poster).

Lossie J. *et al.*, Hypertrophic cardiomyopathy caused by mutations in the essential ventricular myosin light chain gene: analysis of the pathomechanism. PhD-Retreat MDC/FMP 2009, Brandenburg Deutschland (Poster).

Lossie J. *et al.*, Hypertrophic cardiomyopathy caused by mutations in the essential ventricular myosin light chain gene: analysis of the pathomechanism. Day of Science 2008, Berlin Deutschland (Vortrag).

Petzhold D., Lossie J. *et al.*, Atrial myosin light chain reveals a high myosin binding affinity. 37<sup>th</sup> European Muscle Conference 2008, Oxford England (Poster).

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, Janine Lossie, geb. 22.02.1979 in Berlin, an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben und alle verwendeten Hilfsmittel und Quellen als solche ausgewiesen zu haben.

Des Weiteren versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nie in dieser oder anderer Form Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens war.

Die dem angestrebten Promotionsverfahren an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, den 02. Februar 2012

Janine Lossie